

THESE DE DOCTORAT D'ETAT ES SCIENCES NATURELLES

présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES

de PARIS

par

Jacqueline DONJON de SAINT MARTIN

pour obtenir

le grade de Docteur Es-Sciences

Sujet de la Thèse :

CONTRIBUTION A L'ETUDE IMMUNOLOGIQUE DES CONSTITUANTS
DE LA MUQUEUSE GASTRIQUE DU SINGE PAPIO PAPIO

Soutenue le 10 Décembre 1970 devant la Commission d'Examen

MM. J.A. THOMAS	Président
A. HOLLANDE	Examineur
C. HOUILLON	"
A. EYQUEM	Invité
G.A. VOISIN	"

THÈSES

présentées à

LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

pour obtenir

le ... GRADE ... de DOCTEUR d'Etat Es-Sciences Naturelles

par Melle. DONJON DE SAINT MARTIN Jacqueline

Sujet de la 1ère Thèse : " Contribution à l'étude immunologique des constituants de la muqueuse gastrique du singe Papio papio "

Sujet de la 2è Thèse (propositions données par la Faculté)

Soutenues le 10 DECEMBRE 1970 devant la Commission

composée de Président : J.A. THOMAS

Examineurs : A. HOLLANDE

C. HOUILLON

A. EYQUEM

Invité : G.A. VOISIN



Nous tenons à exprimer tous nos remerciements à

Monsieur le Professeur J.-A. THOMAS,
Professeur à la Faculté des Sciences de Paris
Membre de l'Académie de Médecine

qui nous a fait l'honneur d'accepter la Présidence
de cette Thèse, et qui a suivi avec un intérêt
soutenu le développement de ce travail.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549902_0015

Nous sommes très heureux d'exprimer notre gratitude à

Monsieur le Docteur A. EYQUEM

Chef de Laboratoire à l'Institut Pasteur

qui nous a accueilli dans son Service. Il nous a guidé avec beaucoup de bienveillance et de patience.

Nous avons entrepris ce travail sous son impulsion.

Nous lui sommes reconnaissant de nous avoir inculqué des méthodes de raisonnement scientifique et de nous avoir appris à cerner un problème, à appliquer les techniques immunologiques à leur solution et à discuter les résultats obtenus.

Nous remercions

Monsieur le Professeur A. HOLLANDE,
Professeur à la Faculté des Sciences de Paris

Monsieur le Professeur C. HOUILLON,
Professeur à la Faculté des Sciences de Paris

Monsieur le Docteur G.-A. VOISIN,
Directeur de Recherches à l'Association Claude Bernard
Directeur-Adjoint du Centre d'Immunopathologie
de l'Hôpital Saint-Antoine

d'avoir bien voulu accepter de faire partie de notre Jury.

Nous adressons nos remerciements respectueux à

Monsieur le Docteur P. MERCIER,
Directeur de l'Institut Pasteur

qui a autorisé la réalisation de ce travail en nous
intégrant dans les Cadres du Personnel Scientifique
de l'Institut Pasteur.

Nous remercions

Monsieur le Docteur C. LAPRESLE,
Chef de Service à l'Institut Pasteur
qui a bien voulu s'intéresser à cette étude
et nous aider de ses conseils.

Nous remercions nos Maîtres et Collègues à l'Institut Pasteur,
au C.N.R.S. et à l'Université

Monsieur le Docteur P. BURTIN,
Directeur de Recherches au C.N.R.S.

Monsieur le Docteur A. BUSSARD,
Chef de Service à l'Institut Pasteur
Directeur de Recherches au C.N.R.S.

Madame le Docteur D. DONIACH,
MRCP, Reader in Immunopathology

Monsieur le Docteur P. GOLSTEIN,
Maître-Assistant à la Faculté des Sciences d'Orsay

Monsieur le Professeur P. GRABAR,
Chef de Service Honoraire à l'Institut Pasteur

Monsieur le Docteur H. HIRSCH-MARIE,
Chef du Laboratoire d'Immunochimie du
C.H.U. Saint-Antoine

Monsieur le Docteur J. LEVADITI,
Chef de Service à l'Institut Pasteur

qui ont bien voulu nous faciliter l'exécution de différentes
techniques.

Nous remercions tout particulièrement

Mme J. CAVILLON et Melle R. KIENZLE de l'aide qu'elles nous ont apportée.

Que les Travailleurs du Laboratoire d'Hématologie et des Groupes Sanguins qui nous ont aidé, trouvent ici l'expression des remerciements que nous aimerions pouvoir leur adresser personnellement.

Les reproductions photographiques ont été exécutées par le Service de Photomicrographie de l'Institut Pasteur, dont nous tenons à remercier les Techniciens.

S O M M A I R E

P R E M I E R E P A R T I E

INTRODUCTION

<u>CHAPITRE 1</u>	HISTORIQUE	3
<u>CHAPITRE 2</u>	MATERIEL ET METHODES	
A - MATERIEL		12
B - METHODES		
1°	Précipitation en milieu gélifié	15
2°	Analyse électrophorétique	16
3°	Analyse immunoélectrophorétique	17
4°	Les mobilités électrophorétiques	18
5°	Les réactions de caractérisation	19
6°	La réaction de Fixation du Complément	22
7°	Séparation des Immunoglobulines	23
8°	Technique d'étude des Protéases	
a)	Mise en évidence	24
b)	Dosage de l'activité protéolytique	25
c)	Chromatographie sur échangeurs d'ions ...	35
9°	Immunofluorescence et Techniques histologiques	36
10°	Techniques radioimmunologiques	38

DEUXIEME PARTIE

RESULTATS

CHAPITRE I INVENTAIRE DES CONSTITUANTS DE LA MUQUEUSE GASTRIQUE DU SINGE PAPIO PAPIO

1°	Résultats de l'analyse électrophorétique	44
2°	Constituants caractérisés par une réaction spécifique	51
3°	Résultats de la filtration sur Gel de Sephadex G-200	54
4°	Antigènes spécifiques d'organe révélables à l'aide d'un autoanticorps	57

CHAPITRE II LES PEPSINOGENES

1°	Mise en évidence	59
2°	Caractérisation des pepsinogènes	
	a) Séparation	62
	b) Propriétés des pepsinogènes	66
3°	Communautés antigéniques	71
4°	Localisation des Pepsinogènes	74

CHAPITRE III LE FACTEUR INTRINSEQUE

1°	Mise en évidence	78
2°	Etude des immunsérums anti-Facteur Intrinsèque ...	81
3°	Communautés antigéniques	84
4°	Localisation du Facteur Intrinsèque	88

T R O I S I E M E P A R T I E

DISCUSSION

A - PLURALITE DES PEPSINOGENES. SONT-ILS DES ISOENZYMES ? ...	97
B. - COMMUNAUTES ANTIGENIQUES	102
C. - LES AUTO-ANTICORPS ANTI-ESTOMAC	111
RESUME ET CONCLUSIONS	118
BIBLIOGRAPHIE	124

P R E M I E R E P A R T I E

INTRODUCTION

L'estomac présente une grande variété de constituants doués de fonctions très différentes les uns des autres, notamment des protéines à activité enzymatique, des globulines à activité immunologique et des mucines.

Parmi les enzymes de la digestion, les plus anciennement connus sont les pepsines, qui sont secrétées sous forme de précurseurs inactifs dans la muqueuse gastrique; ceux-ci se transforment, en présence de l'HCl du suc gastrique, en enzymes actifs.

La muqueuse est recouverte d'un film protecteur de mucus empêchant l'autolyse. Ce mucus comprend, au moins, trois groupes de substances : les sialoprotéines secrétées par les cellules muqueuses du collet des glandes, les polysaccharides sulfatés (héparine et chondroïtine) et les fucomucines. Parmi ces dernières, il faut réserver une place spéciale aux substances A, B et H de groupes sanguins, dont on admet généralement que la répartition varie selon qu'on a affaire à un sujet sécréteur ou non-sécréteur.

Certaines des glycoprotéines sont capables de se lier à la vitamine B12; la plus importante est certainement le facteur intrinsèque de Castle.

La muqueuse gastrique possède aussi des constituants non spécifiques d'organe, les protéines sériques en particulier. Un catabolisme protéique important s'opère à ce niveau, qui est accéléré dans les gastropathies exsudatives. Les cellules plasmocytaires de la muqueuse secrètent des quantités importantes de globuline IgA. Ces globulines de sécrétion diffèrent de leurs homologues sériques par la présence sur leur molécule d'un élément supplémentaire ou "secretory piece".

Cette étude a été limitée à la mise en évidence des substances antigéniques de la muqueuse gastrique du singe Papio papio, parmi lesquelles nous avons étudié spécialement les protéases et le facteur intrinsèque. L'importance du facteur intrinsèque est soulignée par les problèmes posés par l'anémie de Biermer - ou anémie pernicieuse -, qui est caractérisée par un défaut d'absorption de la vitamine B12 et dont le caractère de maladie autoimmunitaire est maintenant reconnu.

H I S T O R I Q U E

L'exploration des mécanismes chimiques de la digestion a commencé lorsque Réaumur a eu l'idée d'introduire de petits récipients métalliques perforés contenant de la viande dans des estomacs d'oiseaux (114). En ouvrant les récipients récupérés, il n'a pu que constater la dissolution de la nourriture. C'est l'Abbé Spallanzani (143) qui, en 1782, a prouvé que l'agent responsable de la dissolution de la viande était contenu dans le liquide gastrique.

Le 19^e Siècle a été l'époque de nombreuses observations sur des fistules gastriques et du début des Travaux sur les sécrétions gastriques. Corvisart et Leroux (30) ont eu l'occasion d'observer l'aspect de la muqueuse gastrique, les mouvements ondulatoires de l'estomac, par une fistule accidentelle chez une femme de 47 ans. Ils ont, avec Clarion, entrepris l'étude chimique du suc gastrique avec les moyens de l'époque. Le suc leur a paru très semblable à la salive. L'acide chlorhydrique a été reconnu comme l'un des responsables de la digestion par W. Prout en 1824 (110). Les observations pratiquées par Beaumont (13) sur un malade porteur d'une fistule gastrique lui ont permis d'affirmer l'intervention d'une seconde substance, co-responsable de la digestion.

C'est Th. Schwann, (133) en 1836, qui a séparé la pepsine du suc gastrique, après avoir observé la digestion de caillots sanguins par des extraits acidifiés de muqueuse gastrique de boeuf. Parallèlement, Deschamps (31) a étudié la composition de la présure utilisée dans la fabrication des fromages.

Les travaux effectués au 19^e Siècle par Dumas (34),

Hammarsten (60) ont été surtout consacrés aux protéases des Ruminants : la pepsine et la rennine (ou présure). La rennine est sécrétée, sous la forme d'une pro-rennine inactive, dans l'abomassum du veau de lait, et elle n'a été mise en évidence chez aucun autre animal jusqu'à présent.

En 1882, Langley découvrait le précurseur de la pepsine, le pepsinogène et lui donnait ce nom (89).

C'est en 1930 que Northrop (104) réussit la cristallisation de la pepsine de l'estomac de porc et ce fut - après l'uréase - le second enzyme cristallisé. La pepsine était dosée en titrant, par le formol, les radicaux acides libérés à partir de différents substrats : édestine, caséine, ovalbumine et gélatine. Le prix Nobel lui fut attribué en 1946 pour ses travaux sur la pepsine et le pepsinogène.

Une méthode de dosage de la pepsine, plus commode, par hydrolyse de l'hémoglobine, a été décrite par Anson en 1939 (4).

Des travaux concernant les protéases de différentes espèces ont été entrepris depuis. Les résultats les plus nombreux concernent les enzymes d'homme, de boeuf et de porc (28, 71, 92, 117, 123, 137). Les pepsines de poisson et de poulet n'ont pas été oubliées (16, 98).

Ces travaux ont été exécutés pendant que progressaient les techniques de purification et d'analyse des protéines. Northrop a cristallisé la pepsine à l'aide d'une méthode complexe de précipitations salines répétées (104), puis par précipitation alcoolique (105). L'emploi des résines, puis des celluloses échangeuses d'ions a permis de nouveaux progrès. C'est sur Amberlite IRC-50 que Richmond et coll. ont séparé, du suc gastrique humain, deux protéases (116).

Le passage sur Dowex-50 d'une solution commerciale de pepsine permet d'en éliminer les impuretés (62). Ryle et Porter ont séparé 3 pics d'activité protéolytique d'une pepsine brute par chromatographie sur DEAE-cellulose (123).

L'utilisation successive de précipitations salines, chromatographies sur DEAE-cellulose et filtration sur Sephadex a permis à Chow et Kassell d'obtenir une préparation homogène à l'ultracentrifugation et à la chromatographie (28); cette préparation leur a servi à faire l'analyse des acides aminés du pepsinogène de boeuf. Celui-ci comprend 362 ± 2 acides aminés, alors que le pepsinogène de porc préparé selon les mêmes procédés par Rajagopalan et coll. (111) contient 363 acides aminés. Malgré la présence de 22 substitutions, de nombreuses ressemblances ont été observées entre les pepsinogènes de ces deux espèces.

Le pepsinogène ne contient qu'une seule chaîne polypeptidique, la pepsine est située à l'extrémité C-terminale de la chaîne (17). La réaction de transformation du pepsinogène en pepsine est essentiellement auto-catalytique; de plus, elle s'accompagne de la libération d'un composé intermédiaire, comme l'a montré Herriott (66).

Le poids moléculaire de la pepsine est d'environ 35.000, le poids moléculaire du pepsinogène est de 42.000 ± 3.000 (17). Le constituant intermédiaire comprend 6 peptides, dont le plus important est un inhibiteur de la pepsine de poids moléculaire 3.242 avec 29 acides aminés (162). Le complexe peptidique (inhibiteur et 5 peptides) ne se détache qu'au pH 5.4, ce qui explique que la réaction ne soit auto-catalytique que dans ces limites de pH.

L'étude de l'hydrolyse des substrats synthétiques a permis d'approcher la connaissance du mode d'action de la pepsine (10, 45). Elle hydrolyse seulement les liaisons peptidiques, elle est sans action sur les liaisons amides. Les deux acides aminés doivent être de configuration L, l'attaque est facilitée par la présence d'un noyau aromatique sur l'un des acides aminés.

Parmi les autres substances élaborées au niveau de la muqueuse gastrique, une place importante doit être faite au facteur intrinsèque.

L'histoire du facteur intrinsèque et de l'anémie pernicieuse a été relatée par Castle au cours d'une conférence prononcée en 1961 (26). Elle commence en 1822 quand J.S. Combe rapporte le premier cas d'anémie pernicieuse, consécutif à " un désordre des organes de digestion et d'assimilation ". Les altérations histologiques caractéristiques ont été décrites par S. Fenwick (39), qui démontra également l'inefficacité du suc gastrique dans la digestion. Quelques années plus tard, en 1886, Cahn et Von Mehring (23) mirent en évidence l'achlorhydrie du suc gastrique de ces sujets. En 1872, Biermer (15) décrivit un groupe d'anémies sous le nom "d'anémie pernicieuse progressive".

Les résultats des Travaux de Whipple et coll. sur la régénération de l'hématopoïèse des chiens ont conduit Minot et Murphy à introduire du foie cru dans le régime alimentaire des malades atteints d'anémie pernicieuse (101). Ce traitement a eu pour effet une augmentation de l'index réticulocytaire et des globules rouges

des malades. Le prix Nobel de Médecine a été attribué à Minot, Murphy et Whipple en 1934 pour leurs Travaux sur le traitement de l'anémie pernicieuse.

En 1929 Castle démontra que la présence d'un constituant du suc gastrique était nécessaire à l'absorption d'une substance hématopoiétique (25). Il a nommé ce constituant le facteur intrinsèque, par opposition au facteur hématopoiétique apporté par la nourriture ou facteur extrinsèque .

Ce deuxième facteur dont l'importance avait été soupçonnée par Whipple, puis par Minot et Murphy, a été identifié à la vitamine B12, lorsque celle-ci a été isolée du foie par Smith et Parker en Grande Bretagne (142) et par Rickes et coll. aux U.S.A. (115). L'efficacité de la vitamine B12 cristallisée dans le traitement de l'anémie pernicieuse a été démontrée par West en 1948 (168).

Depuis une quinzaine d'années, les résultats obtenus par les différents groupes de chercheurs concernant d'une part la nature et l'isolement du facteur intrinsèque et d'autre part les conséquences d'une auto-immunisation chez les sujets atteints d'anémie de Biermer.

Les Travaux de Glass et coll. (47), et de Grasbeck et coll. (55) en particulier, sur les substances du suc gastrique capables de fixer la vitamine B12, ont permis de mettre en évidence 3 catégories de ces substances :

1°- Le constituant le plus important est le facteur intrinsèque, ou substance "S" (slow), il a une mobilité électrophorétique bêta 2.

2°- Une seconde substance est représentée par le constituant

"S" dégradé par la pepsine. C'est le constituant "I" (intermediate" ayant une mobilité alpha 2-béta.

3°- Le troisième constituant "R" (rapid) n'a pas de rapport avec le constituant "S", notamment au point de vue antigénique. Mais il a des déterminants communs avec d'autres composants des globules rouges, leucocytes et liquides biologiques susceptibles de fixer la vitamine B12 (salive, sérum....).

L'union de la vitamine B12 au facteur intrinsèque est une propriété fondamentale de ces deux substances ; elle ne représente que la première partie du processus d'absorption de la vitamine B12. La deuxième étape se fait au niveau de l'iléon par l'intermédiaire de récepteurs spéciaux, capables d'absorber le complexe IF-B12. Parmi les trois catégories de substances biologiques capables de fixer la vitamine B12, seul le constituant "S" possède la propriété de promouvoir l'absorption du complexe par les récepteurs. C'est le facteur intrinsèque sensu stricto (132).

Les deux derniers constituants "I" et "R" sont responsables de l'absorption d'une quantité non négligeable de vitamine B12 par le suc gastrique.

Les essais de purification du facteur intrinsèque ont été pratiqués à partir de la muqueuse pylorique du porc ou de suc gastrique humain. Les techniques employées sont constituées par une séquence de :

- adsorption-élution sur échangeurs d'ions (76, 77),
- précipitation au point isoélectrique, suivie d'une précipitation par le sulfate d'ammonium et élution sur DEAE-cellulose (35),

- Précipitation au sulfate d'ammonium suivie d'une ultracentrifugation préparative (80).

- Chromatographie sur Amberlite X E - 64 et sur gel de phosphate de calcium, addition de vitamine B12 suivie d'ultracentrifugation et électrophorèse (19).

L'addition de vitamine B12 et l'emploi de la digestion protéolytique ont permis à Ellenbogen et Highley d'obtenir une préparation très active (36).

Les mêmes techniques ont été utilisées pour l'obtention de préparations de facteur intrinsèque humain (27,55,56).

L'antigénicité de préparations de facteur intrinsèque d'homme et de porc a été observée, en 1958, par Taylor et Morton (149). Des anticorps précipitants (85,149), agglutinants (94), capables d'inhiber l'absorption de la vitamine B12 (85,148), ont été mis en évidence dans le sérum des malades atteints d'anémie pernicieuse et dans le sérum des lapins immunisés vis-à-vis de préparations de facteur intrinsèque (94).

La première démonstration in vitro de l'existence d'un anticorps anti-facteur intrinsèque a été apportée par Jeffries (81), par une méthode de rétention électrophorétique sur gel d'amidon.

Depuis, plusieurs modèles de réaction, permettant de mettre en évidence les 2 types d'anticorps anti-I.F., ont été proposés :

- les anticorps bloquants ("blocking antibodies"), qui inhibent la fixation de la vitamine B12 sur le facteur intrinsèque, peuvent être décelés :

- soit par la méthode au charbon décrite par Ardeman et Chanarin en 1963 (5), puis adaptée par Herbert (65),

- soit par d'autres procédés permettant la séparation de la vitamine B12 libre de la vitamine liée. Parmi ces techniques, citons la dialyse et la filtration sur gel de Sephadex, (1) la précipitation du complexe antigène-anticorps par le sulfate d'ammonium

- les anticorps actifs sur le complexe I.F.-B12 ("binding antibodies") ont été mis en évidence par immunodiffusion et immunoelectrophorèse par Gullberg et Kistner (57). La réaction est visualisée après contact avec un film sensible aux rayons X. La sensibilité de la réaction est augmentée dans la modification proposée par Samloff et Barnett (128) avec l'emploi d'un sérum anti-globulines d'homme ou de lapin. Ce type d'anticorps anti-I.F. inhibe l'absorption de la vitamine B12 au niveau intestinal ; cette activité peut être mesurée par la réaction proposée par Sullivan et coll. (146) utilisant un homogénat de muqueuse iléale de cobaye.

Le problème de la localisation du facteur intrinsèque n'a été abordé, à notre connaissance, que par un petit nombre d'auteurs.

En 1934, Meulengracht (100) décrivait la présence d'un facteur anti-anémique dans des lyophilisats de muqueuse pylorique de porc ; des propriétés analogues ont été mises en évidence dans les extraits de muqueuse fundique humaine, par le traitement de Biermeriens. (43,88)

Les premiers travaux de localisation au niveau cellulaire ont été présentés par Hoedemaeker et coll. (72) à l'aide de la technique d'autoradiographie en employant de la vitamine B12 marquée.

Ces auteurs ont ainsi localisé le facteur intrinsèque de rat et de souris dans les cellules principales. Par contre chez l'homme, le Macacus rhesus, le cobaye, le chat et le lapin, ce sont les cellules bordantes qui contiennent le facteur intrinsèque. (73,74)

Plus récemment, Fisher et Taylor (40) ont localisé, par immunofluorescence, le facteur intrinsèque dans les cellules bordantes de la muqueuse gastrique humaine à l'aide de sérum de sujets atteints d'anémie pernicieuse, après absorption à l'aide d'extrait de muqueuse fundique de porc.

C H A P I T R E I I

MATERIEL ET METHODES

A - M A T E R I E L1° - Muqueuse gastrique de Singe

Les estomacs ont été prélevés chez des singes cynocéphales du genre Papio papio à jeun depuis la veille. Les estomacs sont ouverts, lavés puis immergés dans un tampon à +4°C (Bicarbonate d'ammonium 0.02 M, pH 7.5 ou tampon phosphate 0.01 M, pH 8.0). A l'aide de ciseaux, on décolle la muqueuse de la partie musculaire qui est jetée. Des fragments de muqueuse de 1cm² environ sont soumis sous agitation à 2 ou 3 lavages dans le tampon à +4°C. Après centrifugation à 4.000 g. pour séparer le mucus, les fragments de muqueuse sont mis en suspension dans le tampon, broyés à l'aide d'un mixer puis de l'homogénéiseur de Potter. Le broyat est centrifugé à 25.000 g. pendant 45 minutes. Toutes les manipulations sont effectuées à +4°C. Le surnageant est lyophilisé, puis conservé à +4°C. Les autres extraits d'organe ont été préparés de manière similaire, à l'exception des lavages pour le foie et la rate.

2° - Gels de Dextran et Echangeurs d'ions

Les gels de Dextran proviennent des Ets. Pharmacia à Uppsala. Nous avons utilisé le Sephadex G-200 pour la séparation des protéines gastriques selon leur poids moléculaire, et le Sephadex G-25 pour la séparation de la vitamine B12 libre du complexe Facteur Intrinsèque-B12.

La D.E.A.E. - cellulose - échangeur d'anions - provient des Laboratoires Whatman. Nous avons utilisé l'échangeur sous les deux formes: fibreuse (D E - 22) et granuleuse (D E - 32). La capacité ionique est de $1 \text{ méq} \pm 0,1/\text{g}$.

La forme fibreuse permet d'obtenir des vitesses d'élution plus rapides que les formes en grain mais le pouvoir de résolution de ces dernières est supérieur à celui des formes fibreuses.

La D.E.A.E.-cellulose a été régénérée selon les indications données par le fabricant.

Le D.E.A.E.-Sephadex est un autre échangeur anionique provenant de chez Pharmacia. La capacité des échangeurs Sephadex est plus importante que celles des celluloses échangeurs d'ions (N $3,5 \text{ méq/g}$). La courbe de titration du D.E.A.E.-Sephadex montre deux pK : $\text{pK} = 9,5$ pour les groupes D.E.A.E. normaux et $\text{pK} = 5,7$ pour les groupes D.E.A.E. doubles. Les opérations d'élution sont compliquées par le fait que le gonflement de l'échangeur est en étroit rapport avec la force ionique et le pH, ce qui entraîne des contractions ou des dilatations du gel importantes.

Ces 2 types d'échangeurs nous ont servi à réaliser la séparation des pepsinogènes.

3°- Produits de référence et substrats.

Pour le calcul des mobilités électrophorétiques, nous avons utilisé comme référence :

- du point zéro du Lémane de poids moléculaire 200.000

- que nous devons à l'obligeance du Pr. Dedonder

- du pepsinogène de porc cristallisé pour les électrophorèses effectuées à pH 5.6

Nous avons employé également ce même Pepsinogène de porc (Worthington, Freehold, New-Jersey) pour obtenir des immunsérums destinés à pratiquer la localisation des pepsinogènes.

Les substrats employés pour la mesure de l'activité protéolytique sont les suivants :

- de la sérumalbumine bovine (SAB) à 30% (des laboratoires Poviet Amsterdam)
- de la SAB en poudre des Laboratoires N.B.C. (Nutritional Biochemical Corporation)
- de l'hémoglobine en poudre (NBC)
- de l'Edestine (Mann)

Le Facteur intrinsèque de référence (W.E.S. 942) nous a été aimablement procuré par le Dr. Musolino, Directeur Médical des Laboratoires Cyanamid.

Nous avons utilisé également du facteur intrinsèque des Laboratoires N.B.C.

La cyanocobalamine Co⁵⁸ provient du C.E.A.

Les sérums fluorescents de lapin anti-globulines humaines et de mouton anti-globulines de lapin proviennent de l'Institut Pasteur (Paris).

Le microscope pour examen en fluorescence est un microscope Leitz de type Laborlux avec une chambre photographique Zeiss.

3°- Immunisation des lapins.

Les immunsérums anti-estomac et antisérum de cynocéphale

ont été préparés sur des lapins recevant 2 ou 3 séries de quatre injections hebdomadaires d'antigène dissous en milieu physiologique et mis en suspension dans un volume égal d'adjuvant de Freund complet (Difco) . Chaque lapin a reçu 150 à 250 mg. de protéines.

Les lapins anti-pepsinogène de porc (PgP) ont été immunisés selon le protocole suivant :

J_0 = 5 mg. de PgP mélangés à une suspension de corynebacterium parvum par voie intradermique dans les coussinets plantaires

J_{21} = injection de rappel de 10 mg. de PgP émulsionnés dans de l'adjuvant de Freund complet

J_{70} = deuxième rappel de 5 mg. de PgP avec de l'adjuvant de Freund complet

J_{86} = Saignée des animaux

Les lapins anti-facteur intrinsèque ont été immunisés de manière assez semblable, en pratiquant un 3ème rappel supplémentaire.

B - M E T H O D E S

1°- Précipitation en milieu gélifié

Nous avons employé la technique de précipitation en double diffusion, selon Ouchterlony (106).

La précipitation qualitative a permis d'étudier les antigènes communs entre des extraits de différents organes ; estomac et colon, par exemple - les rapports existant entre pepsinogène et pepsine. Nous avons dosé les anticorps anti-

minutes avant d'être mélangés à un volume égal de gélose non-tamponnée et déposés dans le puits. La quantité de protéines gastriques soumise à l'électrophorèse varie selon les expériences : pour la mise en évidence des pepsinogènes le dépôt contient 20 à 50 μ g de protéines, pour les électrophorèses colorées par les colorants des protéines, il contient de 0.8 à 1.2 mg.

Après la migration électrophorétique, les plaques sont :

- soit immergées dans un fixateur pendant 15 heures
acide acétique à 5% pour la fixation des protéines
acide acétique à 2% dans l'alcool méthylique à 50% pour la fixation des glycoprotéines,
- soit soumises à la réaction de caractérisation enzymatique.

Dans ce cas, la fixation s'effectue après cette mise en évidence.

Elles sont ensuite séchées à l'étuve à 37°, sous un papier filtre. Les protéines sont mises en évidence par un colorant: Amido Schwartz à 2%, Rouge Ponceau ou bleu de Comassie, qui est le plus sensible.

3°- Analyses Immunoélectrophorétiques.

Nous avons pratiqué ces analyses selon la technique décrite par Grabar et Williams (53, 54).

Après la séparation électrophorétique, les gouttières creusées parallèlement au sens du courant sont vidées de la gélose puis remplies d'immunsérum. Après 2 à 5 jours de contact, les plaques sont lavées à l'eau physiologique pour éliminer les protéines non précipitées puis soumises à la dessiccation sous

papier filtre, à l'étuve à 37°C ou au ventilateur. Les plaques sont colorées comme les électrophorèses simples.

Les sérums anti-muqueuse gastrique ont été absorbés à l'aide de sérum de singe dans les conditions suivantes : à un ml. d'immunsérum, on ajoute II ou III gouttes de sérum. Le mélange est introduit dans un tube capillaire et déposé à 37°C, pendant 3 heures. Les tubes sont alors centrifugés à 5.000 tours/min. pendant 30 minutes. Le surnageant est décanté et conservé. Les absorptions à l'aide de broyat d'organes ont été pratiquées de la même manière, en ajoutant 20mg. de poudre lyophilisée à 1 ml. d'immunsérum. L'efficacité de l'absorption est vérifiée par immunodiffusion en gélose, en mettant en présence le sérum épuisé vis-à-vis de l'antigène ayant servi à l'absorption.

4°- Les mobilités électrophorétiques

Les mobilités électrophorétiques ont été mesurées selon la technique décrite par Grabar et coll. (52). Le lévane de poids moléculaire 200.000 a été utilisé comme référence du point de mobilité zéro. La mobilité relative a été calculée en prenant la sérumalbumine de singe Papio papio comme protéine de référence à pH 8.6 . Pour les électrophorèses effectuées à pH 5.6, le constituant le plus anodique du pepsinogène de porc a été choisi comme protéine de référence, car la sérumalbumine a une mobilité très réduite à ce pH.

5°- Les réactions de caractérisation après analyse électrophorétique et immunoélectrophorétique.

Les glycoprotéines ont été mises en évidence par la réaction PAS - Schiff selon une adaptation par Uriel (161) de la technique histologique classique.

Les lipoprotéines sont mises en évidence sur des plaques parfaitement sèches à l'aide de solution saturée de Noir Soudan dans l'alcool à 60° (154).

Différents enzymes ont pu être caractérisés après analyse électrophorétique en gélose ou sur acrylamide-agarose.

Ce sont les estérases

les peroxydases et catalases

les phosphatases acides

les lacticodéshydrogenases

a) la répartition des estérases a été étudiée, chez les Rongeurs, principalement. L'acétylcholinestérase existe dans la plupart des organismes animaux, même primitifs et, spécialement, dans le cerveau, le muscle, les surrénales et les globules rouges.

Les estérases carboxyliques de la muqueuse gastrique de cynocéphale ont été mises en évidence, après électrophorèse et immunoélectrophorèse en gélose par les esters de naphtyle et d'indoxyle, selon les techniques décrites par Uriel (158).

Ester de β -naphtyle

Le β -naphtol libéré par hydrolyse de l'ester se couple à un sel de diazonium en provoquant la formation d'un colorant azoïque.

On dissout 5 mg d'acétate de β -naphtyle (Gurr. Ltd)

dans 0,5 ml d'acétone et on ajoute 25 ml de tampon phosphate 0,15 M pH 7.4 . Il se forme une solution opalescente dans laquelle on dissout directement 10 mg de diorthoanisidine diazotée (Diazoblu B, N B C) . La solution est filtrée et utilisée immédiatement. Des taches roses violacées apparaissent entre 15 et 30 minutes.

Esters d'indoxyle

L'indoxyle libéré par hydrolyse de l'ester est oxydé en présence d'O₂ atmosphérique en un colorant insoluble, le Bleu d'indigo.

On dissout 5 mg d'acétate d'indoxyle dans 0,5 ml d'acétone et on ajoute 22 ml de tampon Véronal 0,05 M pH 8.2 et 2,5 ml d'acétate de cuivre 10⁻³ M. Des bandes bleues apparaissent entre 30 et 60 minutes.

Peroxydases et Catalases

Elles sont très répandues dans les tissus animaux et ont été isolées, cristallisées du foie, du rein et des globules rouges.

Les peroxydases ont été caractérisées par la réaction à la benzidine. (155) Ce substrat est oxydé en un produit bleu (étape enzymatique) puis brun. Le milieu est constitué de :

Benzidine à 1% dans l'alcool méthylique 10 ml

Alcool méthylique.....,..... 60 ml

Tampon acétate-acide acétique 2M pH 4.0 10 ml

Eau oxygénée 120 volumes quelques gouttes

Les Catalases sont mises en évidence par immersion dans l'eau oxygénée. Il se forme des bulles d'O₂ qui sont emprisonnées dans le gel (156).

c) Les Phosphatases ont été mises en évidence selon la technique décrite par Burstone (22) et modifiée par Uriel (160).

Le naphthol libéré par hydrolyse du Naphtol-AS se couple au sel d'hexazonium et il y a formation d'un complexe rouge-violet en 1 à 2 heures.

Le milieu d'incubation est composé de : 5 mg de Naphtol-AS biphosphoric acid dissous dans 20 ml de tampon acétate pH 4.8 et dans lequel on ajoute 10 mg de Garnet G B C.

d) Les lacticodéshydrogénases sont très répandues, spécialement dans le tissu musculaire, le coeur et le foie, organes à partir desquels ils ont été purifiés et cristallisés.

Nous avons recherché la présence de ces isoenzymes dans la muqueuse gastrique de singe après électrophorèse en acrylamide agarose, selon la méthode décrite par Broun et Avrameas (20). Cette réaction est basée sur le principe de toutes les réactions de mise en évidence des déshydrogénases. Les sels de tétrazolium incolores, captent les électrons arrachés au substrat et sont, de ce fait, réduits en dérivés formazans colorés. Afin d'augmenter la quantité de formazans produits, on ajoute un accepteur intermédiaire d'électrons : le phénazine méthosulfate qui se réoxyde au contact du tétrazolium, et de l'azide de sodium comme agent bloquant des cytochromes.

Le milieu d'incubation est composé de :

- substrat : lactate de sodium (Prolabo).....150 mg.
- coenzyme : N.A.D. (Boeringer)..... 10 mg.
- tétrazolium : * M.T.T. (N.B.C.)..... 10 mg.
- azide de sodium (Merck)..... 50 mg.
- phénazine méthosulfate (Pierce Chemical)..... 1 mg.
- tampon véronal à pH 8.2 20 ml.

La réaction se fait à l'abri de la lumière.

6°- La réaction de Fixation du Complément

La fixation du Complément a été appréciée par la disparition du pouvoir lytique du complément consécutive à sa liaison sur les complexes antigène-anticorps.

Cette réaction s'effectue en deux temps :

- formation pendant 1 heure à 37°C (ou une nuit à 4°C) de l'immun-complexe qui fixe le complément
- mise en présence du complexe avec les globules rouges de mouton sensibilisés par une hémolysine de lapin anti-globules rouges de mouton. Si le complément a été fixé, il n'y a pas d'hémolyse et la réaction est positive.

Il est nécessaire de déterminer la quantité de complément à employer, valeur dont dépend le degré d'hémolyse. Nous avons employé 2 U.H.₁₀₀ de complément. Une U.H.₁₀₀ correspond à la plus petite quantité de complément capable d'hémolyser la totalité des

* M.T.T. = bromure de 3,(4,5 Diméthyl-thiazolyl 1,2) 2,5 diphényl tétrazolium dissous dans 1 ml. d'alcool à 96°.

globules rouges sensibilisés, mais il est d'usage d'utiliser une quantité de complément supérieure à 1 U.H. afin d'éliminer des erreurs dues au manque de précision de la mesure de la dose hémolytique 100%.

L'absence de pouvoir anticomplémentaire de l'antigène est vérifiée en faisant deux titrages du complément en parallèle, l'un en présence et l'autre en l'absence d'antigène.

La quantité d'antigène à utiliser est déterminée en mettant en présence une dilution donnée d'anticorps avec des doses différentes d'antigène.

Les sérums sont dilués de 2 en 2 en tampon de Mayer.

Une série de témoins est effectuée afin de contrôler chaque étape de la réaction.

La lecture des résultats est pratiquée en notant pour chaque tube le pourcentage d'hémolyse. Nous avons choisi comme titre de l'anticorps la dilution précédant celle pour laquelle on obtient l'hémolyse de la totalité des globules rouges sensibilisés.

7°- Séparation des Immunoglobulines

La séparation des globulines IgG de lapin a été effectuée sur colonne de DEAE-cellulose (DE-32) à +4°C, selon la technique décrite par Fleischman et coll. (41). L'échangeur est équilibré avec un tampon phosphate mono- et bi-potassique 0.0175 M à pH 6.55. Dans ces conditions, les globulines IgG ne sont pas absorbées sur la cellulose et elles sont recueillies dans les premiers tubes de la chromatographie. La pureté des IgG a été contrôlée par immunoélectrophorèse, à l'aide d'un sérum de mouton anti-sérum de lapin. Le rendement a été d'environ 60%.

8°- Technique d'étude des protéases.

- a) Mise en évidence après analyse électrophorétique et immuno-électrophorétique.

L'étude électrophorétique des protéases activées nécessite l'emploi de tampon à pH légèrement acide. Les tampons à pH 8.2 ou 8.6 provoquent une dénaturation irréversible de la pepsine.

Cette étude se pratique à pH 5.6 avec un tampon citrate 0,02 M

- | | |
|----------------------|---------|
| - acide citrique | 250 ml |
| - citrate trisodique | 1000 ml |

La révélation de l'activité protéolytique s'effectue selon la technique décrite par Uriel (157). Après la migration, les plaques sont immergées 30 minutes dans un bain de sérumalbumine bovine (S.A.B.) à 0,3% en solution dans un tampon Glycocolle-HCl 0,2 M. Le liquide est décanté et les plaques sont déposées à 37°C. en atmosphère humide pendant 3 heures. La fixation est réalisée pendant la nuit par une solution d'acide acétique à 5% dans l'alcool éthylique à 50%. Après séchage, les plaques sont colorées à l'Amido Schwartz. Des taches blanches apparaissent sur un fond bleu correspondant à la S.A.B. non protéolysée.

Nous avons appliqué cette technique à l'étude de l'hydrolyse d'un substrat végétal : l'Edestine.

L'immunoélectrophorèse est pratiquée dans les mêmes conditions avec des immunsérums de lapin anti-muqueuse gastrique épuisés avec du sérum normal de singe. Après la précipitation qui s'effectue à 4°C, les plaques sont lavées sous agitation à 4°C pendant 48 heures à l'aide d'eau physiologique tamponnée à pH 5.6

Après la dessiccation au ventilateur, la révélation est effectuée de la même manière que précédemment en raccourcissant cependant les temps d'incubation et de post-incubation.

Les arcs de précipitation correspondant aux protéases apparaissent en clair sur fond bleu.

Ces deux techniques peuvent servir à l'étude des pepsinogènes et des pepsines. L'activation du pepsinogène en pepsine s'effectue presque instantanément aux environs de pH 2. On ajuste à pH 2.2, avec de l'HCl 0.1N, la solution de broyat de muqueuse gastrique ou les différents précurseurs séparés par chromatographie. Les tubes sont déposés à 37°C pendant 30 minutes ou à 45°C pendant 10 minutes. Les proenzymes activés sont soumis immédiatement à l'électrophorèse.

Nous avons adapté à cette étude une technique d'analyse électrophorétique de coupes de muqueuse gastrique faites à la congélation. Des coupes d'une épaisseur de 10 μ environ sont collées sur un morceau de papier Whatman n° 1. Celui-ci est ajusté à la taille du réservoir creusé dans la gélose où il est déposé en évitant la formation de bulles d'air. Le réservoir est obturé avec de la gélose à 1,5 % en tampon citrate. Après la migration les plaques sont traitées de la même manière que celles porteuses du broyat de muqueuse gastrique.

b) Dosage de l'activité protéolytique

- par digestion de l'hémoglobine

Selon la méthode originale d'Anson (4), l'hémoglobine dénaturée par la chaleur est digérée dans des conditions déterminées de concentration, de pH et de température. La fraction non

digérée est précipitée par l'acide trichloro-acétique (T.C.A.). Les produits non précipités sont dosés à l'aide du réactif au phénol de Folin, par lecture à 540 m μ ou par la mesure de l'absorption du surnageant à 280 m μ .

L'hémoglobine en poudre est chauffée pendant 1 heure à 56°C, puis elle est mise en solution à 2,5 % dans l'eau distillée. Lorsque la dissolution est achevée et après une légère centrifugation pour éliminer les stromas, le pH de la solution est amené à pH 2,0 avec de l'HCl N et le volume complété de façon à obtenir une solution d'hémoglobine à 2 %. Cette solution doit être utilisée dans la journée.

A partir d'une solution mère de Pepsine de référence à 5 mg/100 ml, on effectue différentes dilutions.

A 1 ml de chaque dilution, on ajoute 5 ml d'hémoglobine à 2 %. Après 10 minutes d'incubation à 35°C, la digestion est arrêtée par addition de 10 ml de T.C.A. 0,3 M. Le mélange est centrifugé après 10 minutes et 5 ml du surnageant sont recueillis pour le dosage par le réactif de Folin, l'autre partie du surnageant est utilisée pour la lecture en ultraviolet. Tous les tubes sont faits en 2 exemplaires. La variation de densité optique est proportionnelle à la quantité d'enzyme.

Anson a défini l'unité pepsique comme la quantité d'enzyme qui produit 1 milli-équivalent de tyrosine par minute (dosé par le réactif de Folin) non précipité par le T.C.A.

Il faut procéder en 3 étapes :

1°- Etalonnage d'une solution de tyrosine à l'aide du réactif de Folin à 540 m μ . Pour 0,001 milli-équivalent de tyrosine,

Dosage de la Tyrosine par le réactif de Folin

D.O. 540 m μ

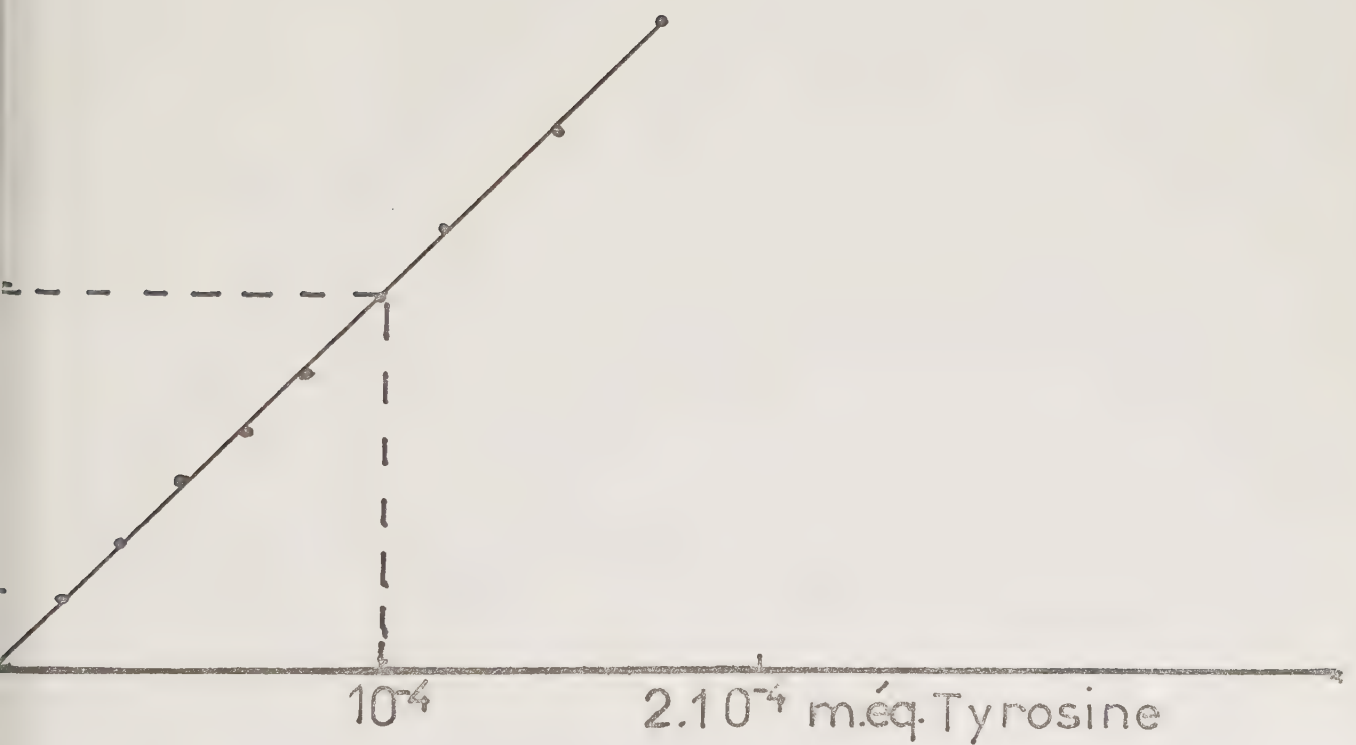


FIGURE N° 1

Digestion de l'Hémoglobine par la Pepsine

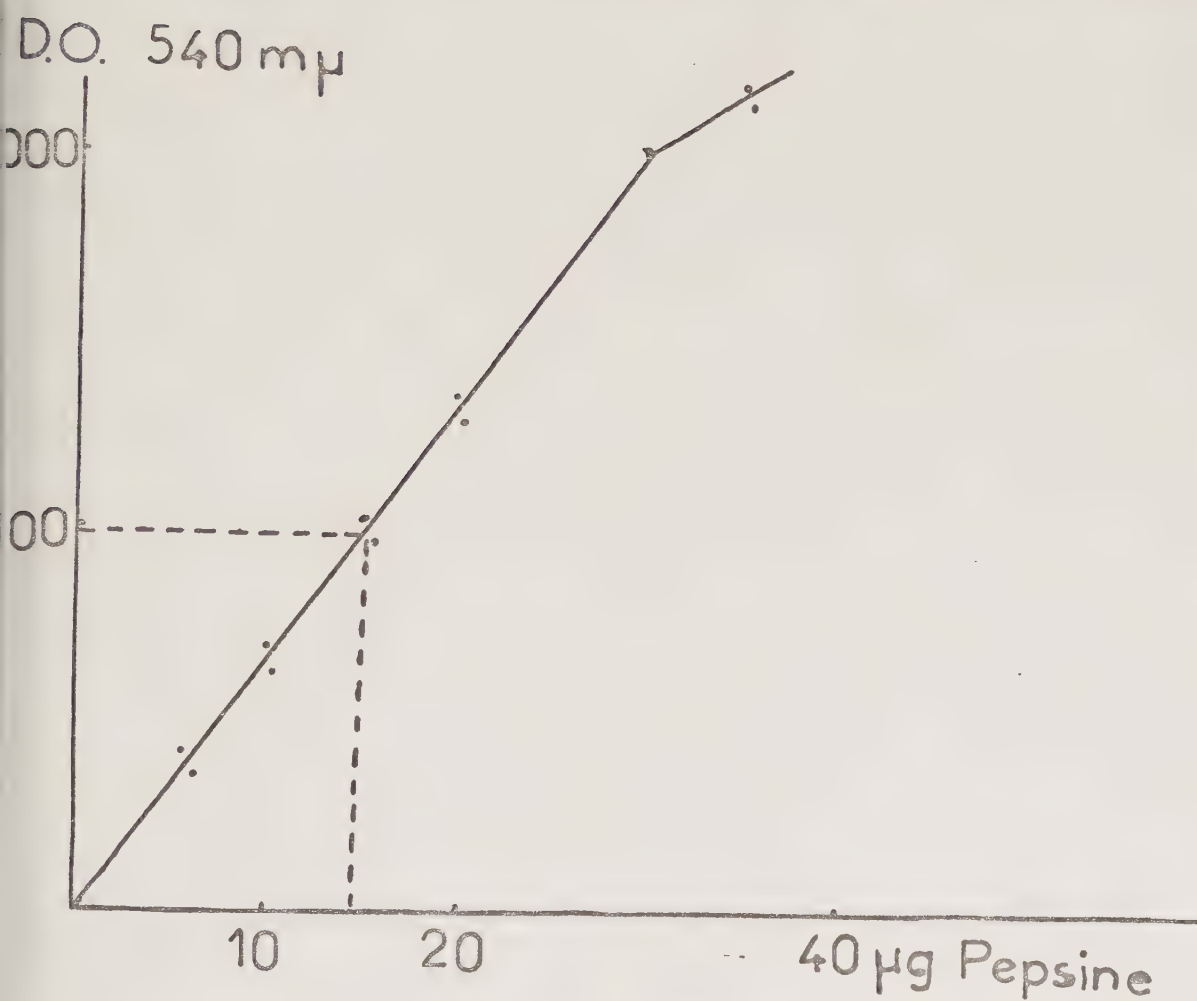


FIGURE N° 2

Dosage de la Pepsine (unités Anson)
(Courbe Standard)

O.O. 540 mμ

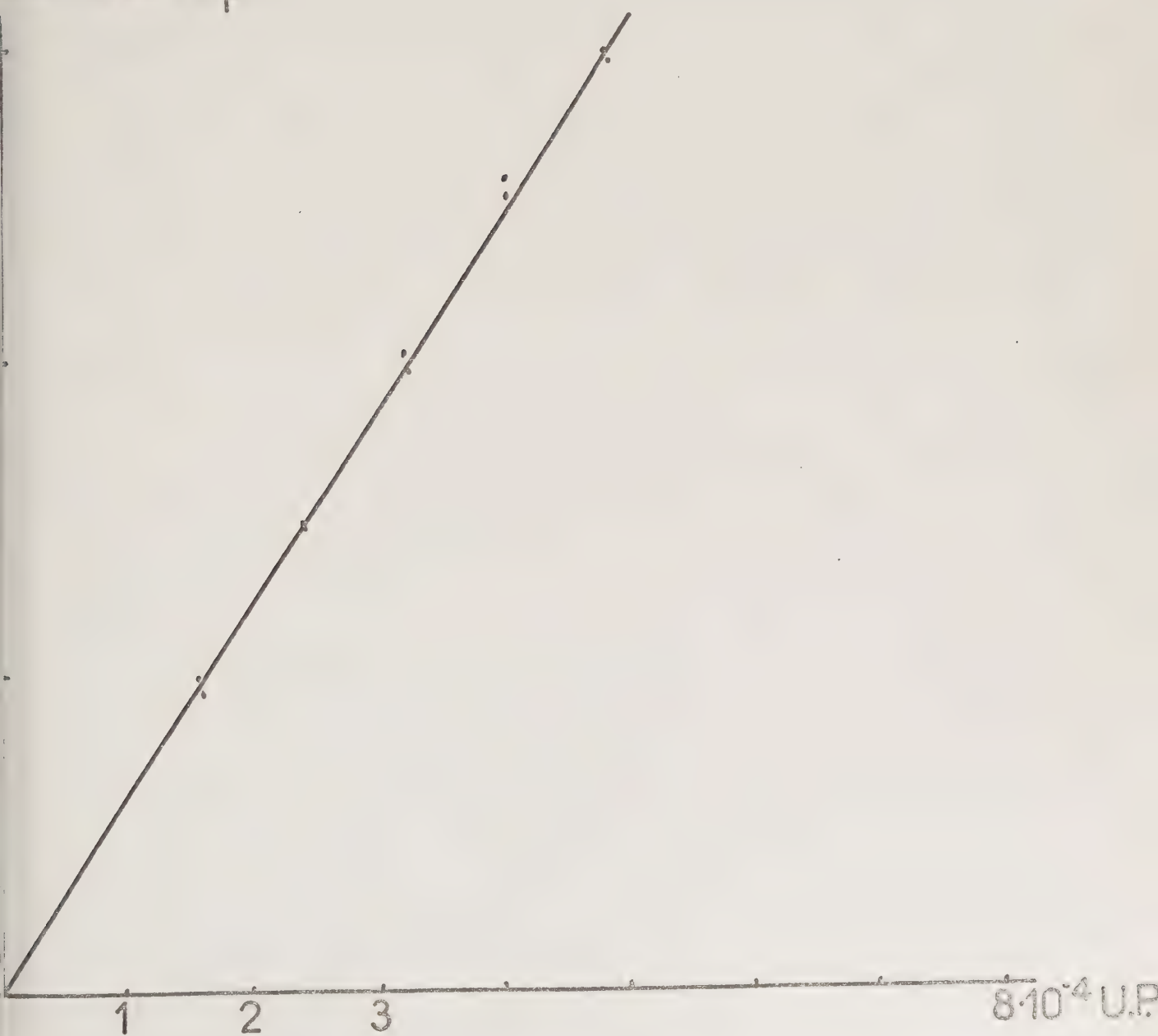


FIGURE N° 3

on obtient une déviation optique de 0,495 (fig. 1).

2°- Digestion de l'hémoglobine par la pepsine et établissement de la courbe indiquant en abscisse la concentration d'enzyme et en ordonnées la densité optique (fig. 2).

On obtient une déviation de 0.495 quand on utilise 14,8 μ g de Pepsine pour digérer 5 ml d'hémoglobine à 2%. En tenant compte des coefficients de dilution et de temps on obtient la valeur de l'unité protéolytique :

$$U P = 14,8 \times 1000 \times \frac{5}{16} \times 10 = 46.200 \mu g$$

3°- Etablissement de la courbe standard représentant la variation de densité optique en fonction des unités protéolytiques. On sait que 14,8 μ g de Pepsine correspondent à une fraction d'U P égale à $\frac{14,8}{46.200} = 3,2 \cdot 10^{-4}$ U P.

C'est sur cette base que l'on effectue la transformation des concentrations d'enzyme utilisé lors de la digestion en fraction d'unité protéolytique pour établir la courbe représentée sur la figure 3.

- par digestion de la sérumalbumine

Ces dosages ont été effectués selon une modification de la technique mise au point par Lapresle et Webb pour le dosage de la cathepsine D. (90). Cette méthode consiste à doser par le réactif du Biuret les produits de l'hydrolyse de la sérumalbumine bovine (S.A.B.) par l'enzyme qui ne sont pas précipités par l'acide trichloro-acétique.

On introduit dans un tube 0,5 ml d'enzyme à doser dilué en

Digestion de la S.A.B. par la Pepsine

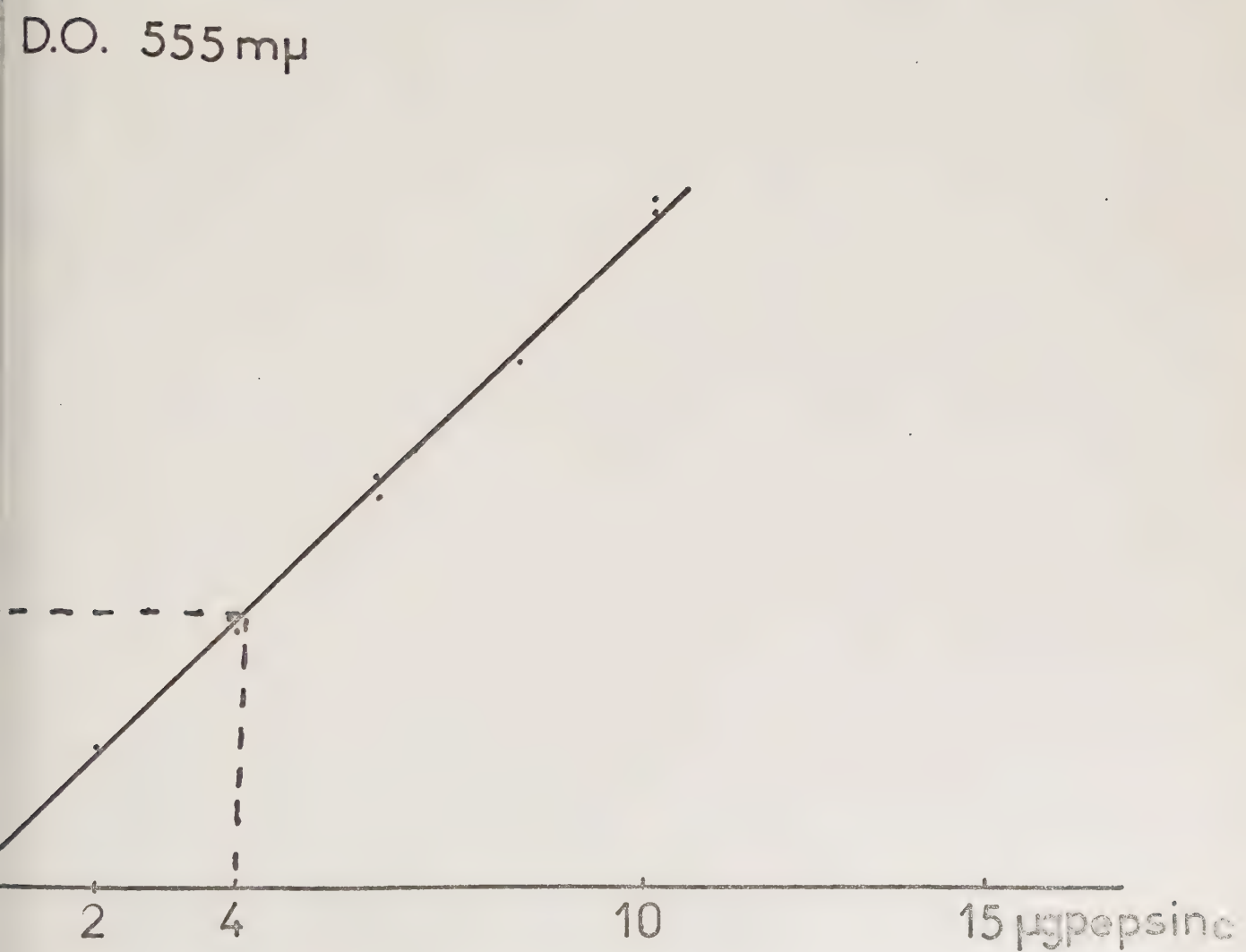


FIGURE N° 4

Dosage de la Pepsine (unités Lapresle)

(Courbe Standard)

D.O. 555 m μ

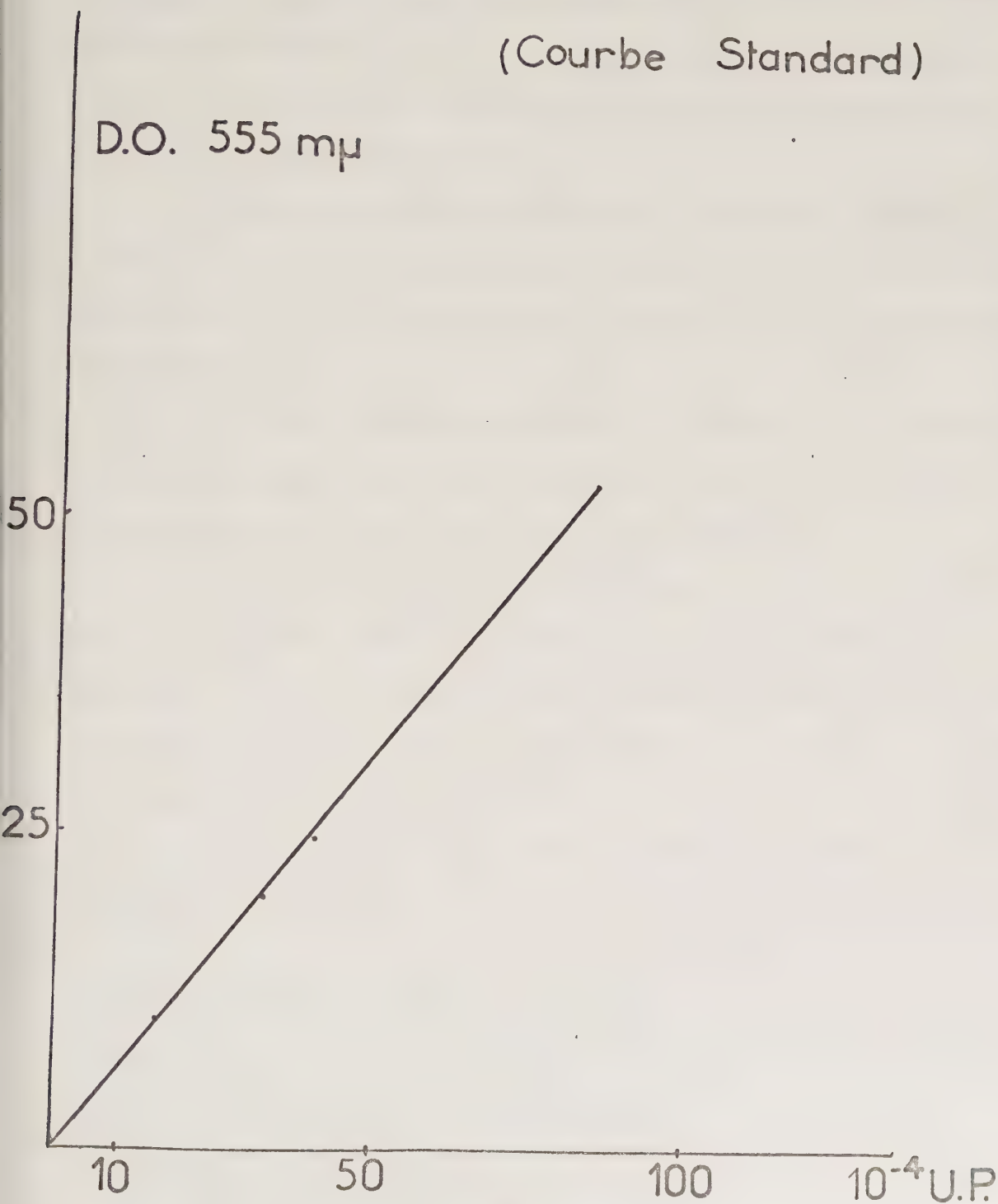


FIGURE N° 5

ClNa 0,15 M et 0,5 ml de S.A.B. à 10 % en eau distillée amenée à pH 2,0 avec de l'HCl 5 N. La digestion s'effectue à 45°C et elle est arrêtée, après 30 minutes, par l'addition de 1 ml de T.C.A. à 4 %. Après 10 minutes de contact, le mélange est centrifugé au froid à 15.000 g pendant 20 minutes. 1 ml de surnageant est mis en contact avec 1,5 ml de réactif du Biuret. Dans le tube blanc, le substrat et l'enzyme sont ajoutés simultanément. La lecture est effectuée à 555 mμ.

On peut également pratiquer la réaction après activation préalable des pepsinogènes à pH 2,0 pour doser l'activité protéolytique des extraits de muqueuse à des pH où l'activation n'est pas instantanée.

L'unité protéolytique est l'activité qui provoque à 555 mμ une augmentation de densité optique de 1 unité, par minute de digestion dans les conditions de l'expérience.

Différentes dilutions d'enzyme en eau physiologique sont mises en contact avec la S.A.B. à pH 2,0. On établit une courbe indiquant les variations de densité optique en fonction des quantités d'enzyme. (fig.4). On abaisse d'un point de la droite une première verticale sur l'axe des ordonnées (D.O.) et une seconde verticale sur l'axe des abscisses (μg enzyme). L'activité spécifique est donnée par la pente $\frac{D.O.}{\mu g \text{ enzyme}}$ divisée par le temps de

la réaction qui est égal à 30 minutes.

D'après la courbe expérimentale établie précédemment (fig.4)

$$(UP) \frac{alb}{\mu g} = \frac{0.100}{4.1 \times 30} = 8.10^{-4}$$

Ce qui revient à dire qu'un μg de pepsine correspond à $8 \cdot 10^{-4}$ UP.

De la même manière que pour la digestion de l'hémoglobine on transforme les quantités de pepsine en unités protéolytiques, ce qui permet d'établir une courbe reliant les variations de densité optique aux unités pepsiques. (fig. 5).

Les chiffres de cette nouvelle courbe sont indépendants de la pureté de l'échantillon considéré. Cette représentation graphique est une courbe standard qui peut être utilisée pour la détermination de l'activité pepsique d'une solution quelconque d'enzyme dans les mêmes conditions de pH et de température et vis-à-vis du même Lot de substrat.

- Réaction de coagulation du lait.

Cette réaction a été effectuée selon la méthode décrite par Seijffers et coll (138).

A 0,5 ml de lait tamponné et calcifié

- | | |
|----------------------------------|-----------|
| - lait écrémé | 5 volumes |
| - tampon citrate pH 5.3, 0.1 M | 5 volumes |
| - $\text{Cl}_2 \text{ Ca}$ 0,1 M | 1 volume |

on ajoute 2 ml d'enzyme dilué dans un tampon acétate pH 5.3.

Les tubes sont déposés au bain-marie à 37°C et l'on note le temps d'apparition de la coagulation du lait. S'il n'y a pas de coagulation après 60 minutes, la réaction est considérée comme négative, La solution étudiée ne contenait que des proenzymes non activés. Cette réaction a été utilisée pour vérifier l'absence de pepsine dans les extraits de muqueuse gastrique.

c) Chromatographie sur échangeurs d'ions.

Après les opérations de régénération, les échangeurs ont été équilibrés en tampon acétate 0.1 M

- Acétate de sodium M.....500 ml.
- Acide acétique M 75 ml.
- Eau distillée..... 5 litres

Nous avons effectué toutes les opérations d'élution à pH constant (pH 5.0 pour le DEAE-Sephadex et pH 5.4 pour la DEAE-cellulose), tout en augmentant la concentration saline du tampon.

Une colonne de 25 x 2 cm. a été utilisée, elle a été maintenue à 4°C pendant la chromatographie. L'extrait de muqueuse gastrique est dialysé une nuit à 4°C vis-à-vis du tampon d'équilibre; 100 à 150 mg de protéines, sous un volume de 30 ml, sont déposés sur l'échangeur.

On applique le tampon acétate qui a servi à équilibrer la colonne jusqu'au retour à zéro de l'absorption à 280 mμ. Les protéines qui sont déplacées par ce tampon sont exclusivement des protéines non catalytiques.

Les modifications de concentration saline ont été effectuées selon deux techniques :

- soit avec un gradient linéaire,
- soit par le procédé de l'élution par étapes ou "stepwise".

Des tampons acétate de plus en plus concentrés en ClNa sont appliqués sur la colonne, après avoir constaté le retour à zéro de l'absorption à 280 mμ.

La composition des tampons a été la suivante :

acétate 0,1 M + ClNa 0,04 M

" " 0,08 M

" " 0,16 M

" " 0,25 M

" " 0,60 M

Des fractions de 10 ml. sont recueillies. On pratique le dosage de l'activité protéolytique par digestion de la S.A.B. Les tubes correspondant aux activités protéolytiques maximales sont dialysés, concentrés et soumis à l'électrophorèse.

9°- Immunofluorescence et techniques histologiques.

Nous avons employé cette méthode pour étudier la localisation des pepsinogènes et du facteur intrinsèque dans la muqueuse gastrique. La localisation des pepsinogènes a été réalisée à l'aide de sérum de lapin anti-pepsinogène de porc. Le facteur intrinsèque a été mis en évidence à l'aide de sérum de lapin anti-facteur intrinsèque de porc ou de globulines purifiées à partir de ces sérums.

Les fragments d'organe sont congelés dans l'azote liquide dans les minutes suivant le prélèvement. Les coupes, d'une épaisseur de 3 μ sont effectuées dans un cryostat, puis séchées dans un courant d'air ou fixées au-dessus de vapeurs d'acétone.

Les dilutions de sérums sont appliquées sur la coupe pendant 20 minutes. Après une série de lavages, on dépose le sérum fluorescent dilué au 1/30 ou au 1/40.

Après 20 minutes, les préparations sont lavées puis montées sous glycérine à pH 8.0. La lecture au microscope à fluorescence est pratiquée le même jour.

Nous avons effectué des colorations histologiques et histochimiques des différentes catégories de cellules de la muqueuse gastrique, comme moyen de contrôle de ces localisations.

Les fragments de muqueuse sont fixés au formol neutre à 10 % ou au liquide de Romeis avant de subir une inclusion à la paraffine.

- Coloration à l'acide périodique-Schiff.

Cette coloration est couramment utilisée pour la coloration des glycoprotéines. Le cytoplasme des cellules muqueuses du col est coloré électivement en rouge violacé par cette technique.

- Coloration à l'Erythrosine-orangé G et Bleu de Toluidine (E.O.B.T.)

Le Bleu de Toluidine, colorant basique, colore en bleu les grains de pepsinogène, très riches en réticulum endoplasmique. Les cellules bordantes, dont le cytoplasme riche en mitochondries a une affinité pour les colorants acidophiles, sont colorées en jaune orangé.

- Coloration par le Bleu Alcian en milieu acétique après oxydation par le $MnO_4 K$. (PBA)

Le Bleu Alcian colore - en milieu acétique - les substances pourvues de radicaux acides induits par oxydation.

Les granulations de cellules principales ont une affinité pour ce colorant, alors que les cellules bordantes sont rose mauve.

- Mise en évidence du Tryptophane selon Adams.

Il s'agit d'une méthode qui peut s'appliquer à la mise en évidence de toutes les protéines riches en tryptophane.

La diméthylaminobenzaldéhyde se condense avec le radical indol du tryptophane en donnant la carboline. Ce produit est oxydé par le nitrite de sodium en bleu de carboline.

L'intensité de la coloration dépend de la richesse en tryptophane, donc du pepsinogène.

10°- Techniques radio-immunologiques.

a) La capacité de liaison de la vitamine B12 marquée au facteur intrinsèque a été mesurée par la méthode au charbon (5,1). Elle consiste à mettre en contact les deux réactifs, puis à séparer - à l'aide d'une suspension de particules de charbon - la vitamine libre de la vitamine liée. En effet la vitamine libre est adsorbée sur le charbon, alors que la vitamine complexée au facteur intrinsèque reste dans le surnageant. La mesure de la radioactivité du surnageant permet d'évaluer la quantité de vitamine B12 liée, et la mesure de la radioactivité du charbon permet d'évaluer la quantité de vitamine B12 libre. Cette méthode a été critiquée car les particules de charbon sont aussi capables d'adsorber des constituants de poids moléculaire plus important que la vitamine B12. Aussi peuvent-elles être recouvertes de sérum (119) ou bien de sérumalbumine ou encore d'hémoglobine (64). Le charbon ainsi

"désactivé" est capable d'adsorber les composés de petit poids moléculaire comme la vitamine B12, mais non les constituants de poids moléculaire élevé.

Du charbon Norit est mis en suspension à 1% dans de la S.A.B. à 1% mise en solution en eau physiologique.

Une solution mère de facteur intrinsèque (I.F. Wes 942) à 1 mg/ml est conservée dans l'azote liquide. Une solution à 10 µg/ml est préparée extemporanément. A des dilutions croissantes d'I.F. sous un volume de 1 ml, on ajoute 5 ng de vitamine B12, soit 0,5 ml. Toutes les dilutions sont effectuées en eau physiologique à pH 7.4 . Après 20 minutes de contact à la température du Laboratoire, on introduit 1 ml de charbon à 1%. Après une forte agitation, puis centrifugation, le surnageant est séparé; on mesure la radioactivité du charbon. Une courbe est tracée indiquant en abscisse la quantité d'I.F. et en ordonnée le pourcentage de vitamine B12 liée à l'I.F. ; celui-ci est calculé selon la formule :

$$\frac{(\text{cpm. de 5 ng de B12} - \text{cpm du charbon}) \times 100}{\text{cpm de 5 ng de B12}}$$

la quantité d'I.F. nécessaire pour fixer 50% (soit 2,5 ng) de la vitamine B12.

Un tube témoin sans I.F. est destiné à vérifier l'efficacité du charbon.

La même technique a été utilisée pour calculer le pouvoir de liaison à la vitamine B12 d'un extrait de muqueuse gastrique de singe, de lapin ou de porc. En règle générale, une solution de broyat de 100 µg à 1 mg/ml a été employée.

b) Les anticorps anti-facteur intrinsèque ont été recherchés d'une part chez des lapins immunisés à l'aide de préparations

purifiées d'I.F. de porc ou vis-à-vis de broyat de muqueuse gastrique de singe Papio papio et d'autre part chez des malades atteints d'anémie de Biermer.

Nous avons recherché dans ces sérums les deux types d'anticorps le plus souvent décrits :

- les anticorps de type "bloquant" qui empêchent la combinaison de la vitamine B12 au facteur intrinsèque,
- les anticorps se fixant sur le complexe I.F.-B12.

Nous avons utilisé des antigènes de différentes provenances : préparations d'I.F. de porc, extraits de muqueuse gastrique de porc, de singe et de lapin.

- La recherche des anticorps bloquants a été effectuée selon la méthode d'Ardeman et Chanarin (5), modifiée par Roitt et coll. (120). Le sérum est mis en contact avec la quantité de facteur intrinsèque capable de se lier à 5 ng de Vitamine B12. Après 30 minutes de contact, on ajoute la vitamine B12, puis le charbon. Si le sérum contient un anticorps de type bloquant, on retrouve une quantité importante de vitamine B12 libre sur le charbon, puisque l'anticorps a "bloqué" les sites de liaison de l'I.F. à la vitamine B12.

Dans l'appréciation des résultats, nous avons tenu compte du fait que le sérum et les préparations d'I.F. possèdent des constituants susceptibles de se lier à la vitamine B12, sans avoir pour autant une activité I.F. ; ils ne sont pas capables d'initier l'absorption de la vitamine B12 par les récepteurs iléaux. Ceci explique pourquoi on ne retrouve pas dans le charbon plus de 4 à 4,5 ng de vitamine B12, même en présence d'un excès d'anticorps.

Par ailleurs, nous avons considéré comme positifs les sérums inhibant la fixation d'au moins 500 pg de vitamine B12 pour 0,1 ml. Pour un anticorps de faible titre, on peut calculer la quantité de vitamine B12 fixée selon la formule :

$$\frac{(\text{cpm avec immunsérum} - \text{cpm avec sérum normal}) \times 5}{\text{cpm B12} - \text{bruit de fond}}$$

- Les anticorps se fixant sur le complexe I.F.-B 12 ont été recherchés par immunodiffusion et immunoélectrophorèse à pH 8.2. Deux méthodes d'analyse immunoélectrophorétique ont été utilisées :

- migration de l'antigène marqué (I.F.-B12), et dépôt de l'immunsérum dans les gouttières,
- migration de l'anticorps et dépôt dans les gouttières d'un mélange d'antigène marqué et d'immunsérum précipitant les globulines. Le complexe radioactif vient alors se fixer sur ce précipité.

L'excès de vitamine B12 peut être éliminé en dialysant pendant une nuit le complexe I.F.-B12 (1), ou par passage sur colonne de Sephadex G-25 (12).

L'immunodiffusion a été réalisée en gélose à 1,5% diluée en eau physiologique tamponnée à pH 7.2 Les dilutions d'anticorps sont effectuées à l'aide de sérum de lapin normal dilué au 1/10. Le facteur intrinsèque et la vitamine B12 sont mélangés dans les proportions définies lors de l'établissement de la courbe de liaison. Dans certains cas on ajoute à l'antigène un volume égal de sérum de mouton anti-sérum ou anti-globulines de lapin, ou de cheval anti-sérum humain selon l'origine de l'anticorps étudié.

L'immunoélectrophorèse selon le premier procédé avec migration de l'antigène marqué n'a été pratiquée que pour mesurer la mobilité du facteur intrinsèque dans la préparation d'estomac de cynocéphale. Nous avons évité d'utiliser cette technique, à cause du risque de contamination de l'appareillage et des tampons d'électrophorèse.

La deuxième méthode d'immunoélectrophorèse a été décrite par Samloff et Barnett (128). Le sérum du lapin immunisé est soumis à l'électrophorèse. Dans la gouttière creusée parallèlement au sens de la migration, on dépose le complexe I.F.-B12 additionné d'un volume égal de sérum de mouton anti-lapin. La dose de radioactivité mise dans chaque rigole varie de 0,05 à 0,1 μ Ci. L'arc de précipitation apparaît en quelques heures; après 20 à 24 heures, les plaques sont lavées sous agitation pendant une journée puis séchées sous un papier filtre au ventilateur.

Les témoins sont constitués principalement par une précipitation en deux temps :

- 1°- l'addition du seul sérum anti-globulines est suivie des lavages, puis de l'addition du complexe radioactif,
- 2°- le sérum anti-globulines est déposé dans les rigoles avec l'un ou l'autre des constituants du complexe. Le deuxième constituant est ajouté après la première série de lavages.

De plus, des témoins ont été effectués à l'aide de sérums de lapins normaux, de lapins immunisés vis-à-vis de pepsinogène et d'adjuvant de Freund.

Une fois séchées, les plaques de gélose sont mises en

contact, à l'obscurité, avec un film sensible aux rayons X (film Kodirex, Kodak) durant un temps variable de 24 heures à 15 jours. Les films sont ensuite développés. Les plaques de gélose sont colorées à l'amidoschwartz, afin de comparer les résultats à ceux de l'autoradiogramme.

* * * * *
* * *
*

Le contrôle de la présence des anticorps bloquants à l'aide de suc gastrique humain, dans le sérum de malades atteints ou suspects d'anémie de Biermer, a été effectué par Mme. le Docteur Doniach, The Middlesex Hospital à Londres. Les mêmes échantillons ont été examinés par nous-même en parallèle, en utilisant des extraits de muqueuse gastrique de Papio papio et du facteur intrinsèque de porc.

D E U X I E M E P A R T I E

RESULTATS

C H A P I T R E I

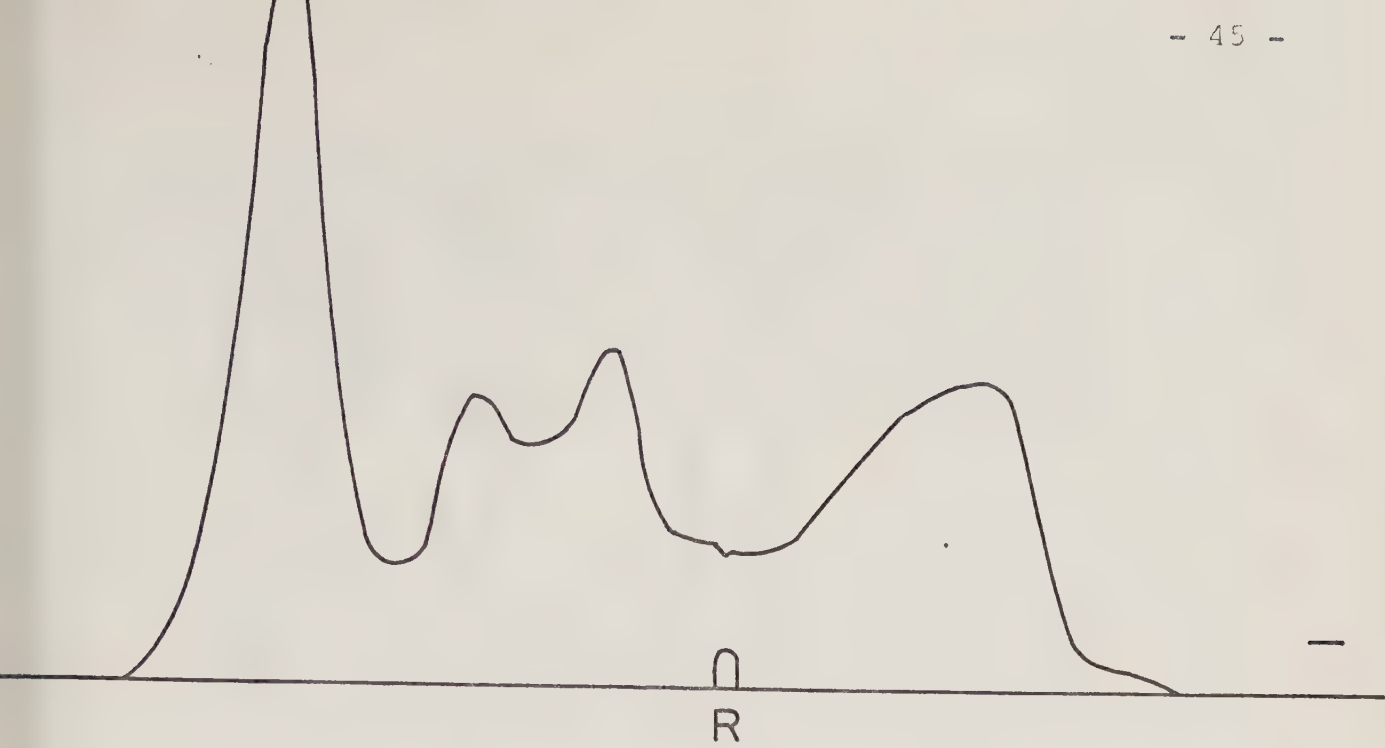
INVENTAIRE DES CONSTITUANTS DE LA MUQUEUSE GASTRIQUE
DU SINGE PAPIO PAPIO1°- Résultats de l'analyse électrophorétique.

a) Mobilités électrophorétiques.

Les figures 6 et 7 représentent les diagrammes comparatifs d'enregistrement de l'électrophorèse à pH 8.6 du sérum de singe normal et d'un broyat de muqueuse gastrique provenant de plusieurs animaux.

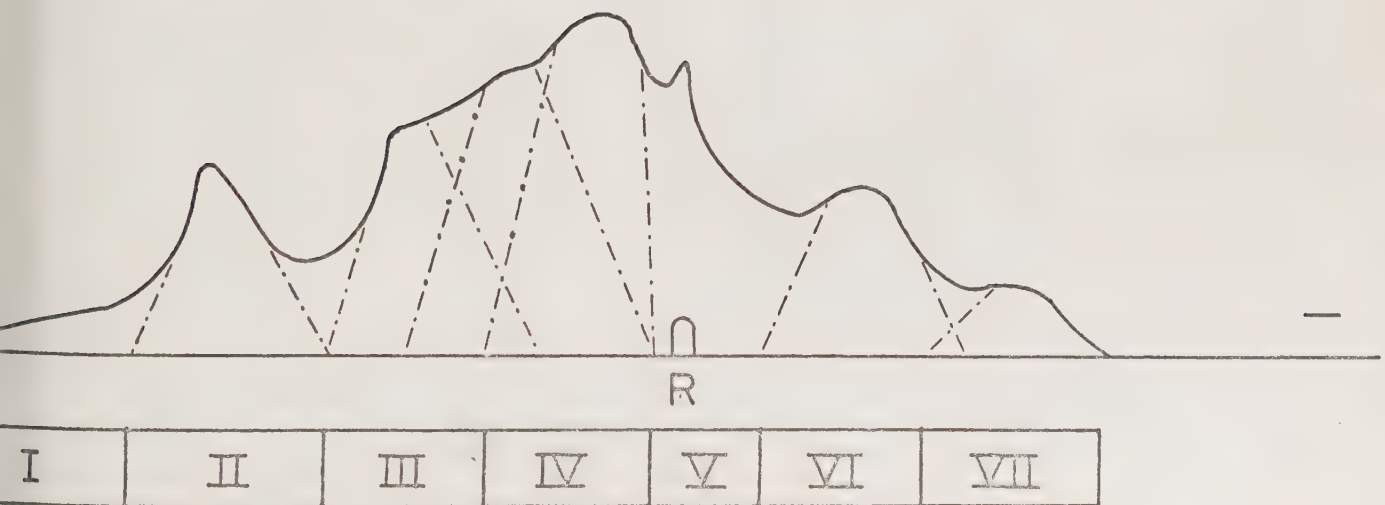
Le diagramme du broyat de muqueuse a été divisé en 7 zones, numérotées, selon la nomenclature proposée par Rapp et coll. (113) de I à VII en allant de l'anode à la cathode. Chacune des zones comprend 1, 2 ou 3 antigènes, qui sont caractérisés par leur mobilité électrophorétique relative, calculée par rapport au Lévine et à la sérumalbumine.

Par analyse immunoélectrophorétique, on peut mettre en évidence onze constituants à l'aide d'un sérum de lapin anti-muqueuse gastrique de singe, épuisé avec du sérum normal de singe et avec un mélange de suspensions érythrocytaires d'homme et de singe. Les figures 8 et 9 et le tableau 1 résument les résultats obtenus.



Courbe densitométrique d'un sérum normal de cynocéphale.

FIGURE N° 6



Courbe densitométrique d'un extrait de muqueuse gastrique de cynocéphale.

+

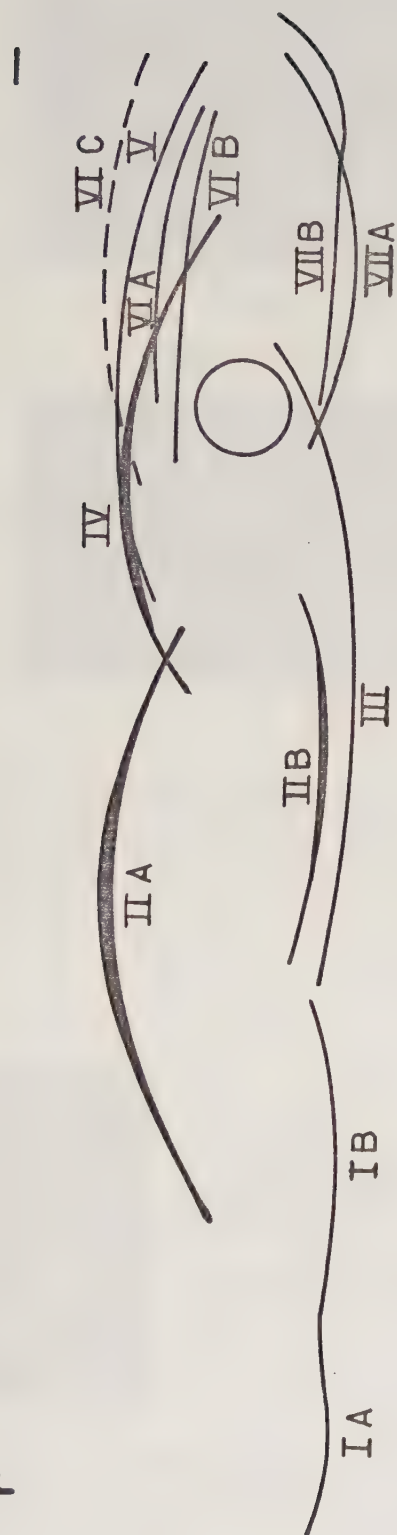


Diagramme immunoélectrophorétique
d'un extrait de muqueuse gastrique.

FIGURE N° 8

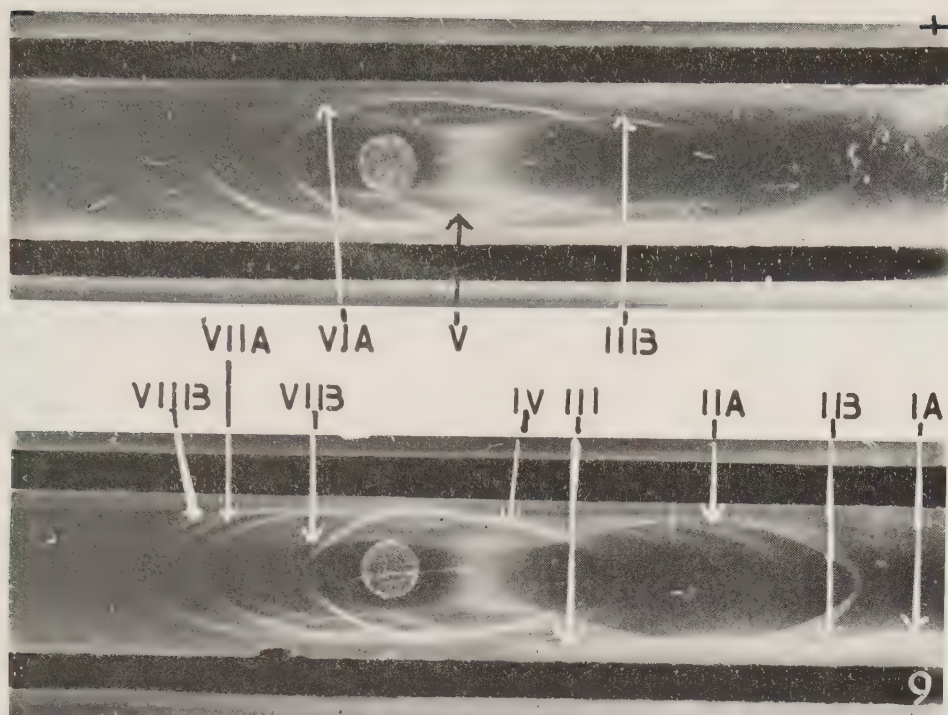


FIGURE N° 9 : Analyse immunoélectrophorétique (AIE) d'un extrait de muqueuse gastrique de singe Papio papio à l'aide de quatre immunosérums de lapin anti-muqueuse gastrique de Papio papio.

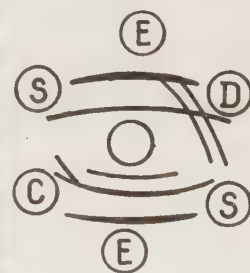
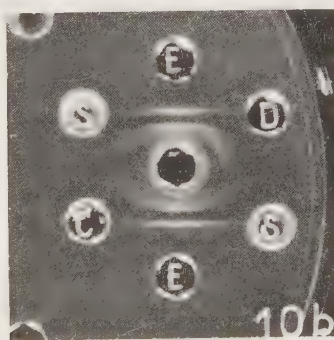
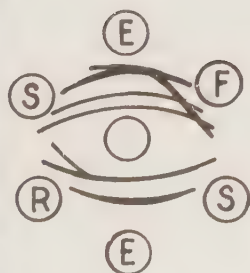
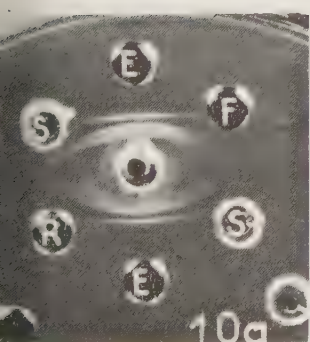
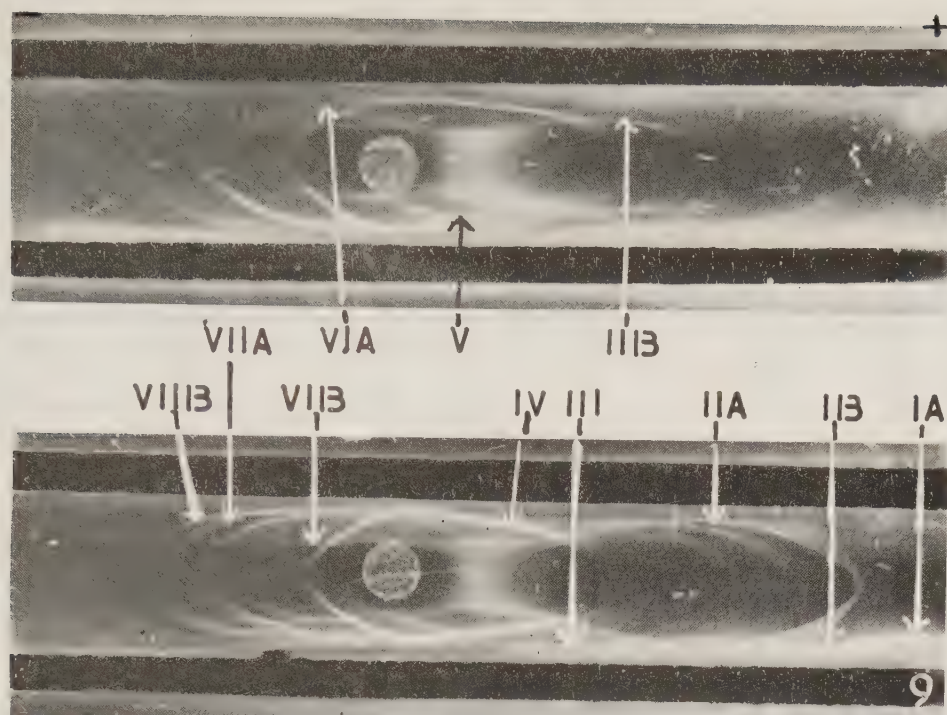
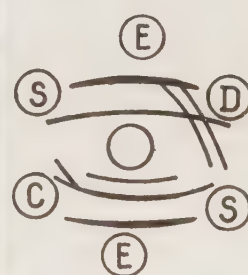
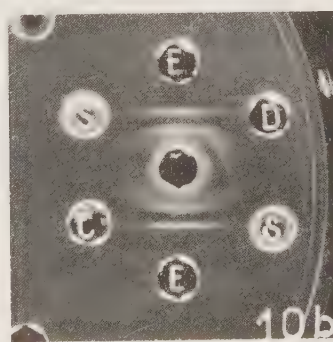
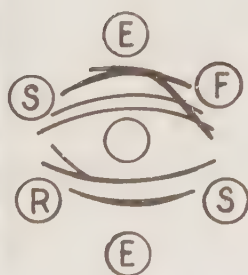
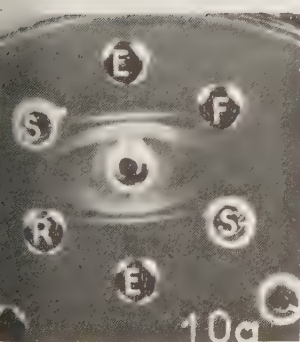


FIGURE N° 10a : Réaction de précipitation en gélose de l'immunosérum 734 (épuisé avec du sérum normal de singe) vis-à-vis d'extraits de différents organes : E = estomac, F = foie, R = rate et S = sérum.

FIGURE N° 10b : Réaction de précipitation en gélose de l'immunosérum 733 (épuisé) vis-à-vis d'extraits de différents organes : E = estomac, D = duodénum et C = colon.



URE N° 9 : Analyse immunoélectrophorétique (AIE) d'un extrait de muqueuse gastrique de singe Papio papio à l'aide de quatre immunosérums de lapin anti-muqueuse gastrique de Papio papio.



URE N° 10a : Réaction de précipitation en gélose de l'immunosérum 34 (épuisé avec du sérum normal de singe) vis-à-vis d'extraits de différents organes : E = estomac, F = foie, R = rate et S = sérum.

URE N° 10b : Réaction de précipitation en gélose de l'immunosérum 33 (épuisé) vis-à-vis d'extraits de différents organes : E = estomac, D = duodénum et C = colon.

Zones	I	II	III	IV	V	VI	VII
Mobilité relative	1.20	1.20-0.90	0.90-0.68	0.68-0.50	0.50-0.38	0.38-0.22	0.22-0.0
Nombre d'antigènes	2	2	1	1	1	3	2
Mobilité des antigènes	IA = 1.60 IB = 1.48 - 1.30	IIA = 1.13 - 0.98 IIB = 0.90	III = 0.835 - 0.740	IV = 0.58 - 0.52	V = 0.46	VIA = 0.36 - 0.25 VIB = 0.34 VIC = 0.34	VIIA = 0.2 - 0.1 VIIB = 0.1
Activité protéolytique	IA = PI IB = PII	IIA = PIII	III = PIV				
Fixation à la vitamine B 12						VIC	

TABLEAU N° 1

Pour chaque antigène, les deux valeurs extrêmes de mobilité sont indiquées. Quand une zone comprend plusieurs antigènes, ceux-ci sont répertoriés avec les lettres A, B ou C : cette dernière étant attribuée au constituant le plus lent.

Afin d'obtenir sur une seule reproduction l'image des arcs correspondant aux protéases et aux antigènes non doués d'activité protéolytique, nous avons immergé dans une solution de Tannin à 1 p. 1.000 les plaques après séchage. En effet, les précipités correspondant aux pepsinogènes - qui ne sont pas colorables par l'amidoschwartz - apparaissent de manière très nette après ce traitement, de même que les arcs correspondant aux antigènes non protéolytiques. Ils peuvent ainsi être photographiés.

Un douzième arc de précipitation correspondant à un constituant fixant la vitamine B12 peut être observé après autoradiographie (fig.8, en pointillé). Il ne peut être révélé ni par le tannin, ni par les colorants des protéines.

b) Les protéines sériques peuvent être mises en évidence de deux manières : soit en recherchant les anticorps précipitant le sérum de singe dans les immunsérums anti-estomac de singe, soit en recherchant, directement, les antigènes de la muqueuse gastrique précipités par un immunsérum de lapin anti-sérum de singe. Les extraits de muqueuse gastrique sont particulièrement riches en sérumalbumine, en globulines de mobilité $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\beta 1$, et en immunoglobulines IgG.

c) Nous avons également mis en évidence des antigènes communs à l'estomac et à d'autres organes par fixation du complément, immunodiffusion et immunoélectrophorèse.

Tous les échantillons de sérum de lapins examinés présentent un anticorps fixant le complément d'un titre de $1/8^{\circ}$ à $1/32^{\circ}$ vis-à-vis de broyat de duodénum, colon et foie de singe. Les anticorps actifs vis-à-vis des extraits de rate ont un titre plus faible ($1/4$). Il n'y a pas d'anticorps vis-à-vis des extraits de muscle lisse ou strié.

Ces anticorps anti-organes peuvent être absorbés, selon la technique décrite par Metzgar (99), par contact avec l'antigène correspondant pendant une nuit à 4°C , suivi d'une ultracentrifugation à 70.000 g. pendant 30 minutes. Cette absorption n'entraîne pas de modification de plus d'une dilution du titre de l'anticorps anti-estomac.

L'immunodiffusion, à l'aide de sérums absorbés avec du sérum normal de singe, permet la mise en évidence de communautés antigéniques entre des constituants du foie, de la rate et de la muqueuse gastrique (fig.10a), ainsi qu'entre les extraits du duodénum, du colon et de l'estomac (fig.10b). L'absence de ligne de précipitation vis-à-vis du sérum de singe montre que des constituants sériques ne sont pas responsables de ces réactions croisées.

L'immunoélectrophorèse d'immunsérums anti-estomac, épuisés avec du sérum de singe, vis-à-vis d'extraits de rate, colon, foie et duodénum permet de mettre en évidence 2 ou 3 arcs de précipitation

Cependant, ces arcs sont beaucoup plus fins que ceux observés avec le broyat de muqueuse gastrique et l'absorption des immunsérums avec ces différents extraits d'organes ne modifie pas

le nombre et l'aspect des arcs de précipitation vis-à-vis de la muqueuse gastrique de singe car les antigènes correspondants sont soit en trop faible quantité ou bien ne présentent que certains déterminants communs sur leur molécule.

2°- Constituants caractérisés par une réaction spécifique.

Différents constituants de la muqueuse gastrique sont ainsi mis en évidence après électrophorèse ou immunoélectrophorèse en gélose, ou encore électrophorèse sur gel mixte de polyacrylamide-agarose.

A - Constituants dépourvus d'activité enzymatique.

- La coloration par le réactif de Schiff après électrophorèse permet de révéler des glycoprotéines dans les zones II, III, IV, V et VI, ces dernières étant le plus vivement colorées. Après immunoélectrophorèse, un seul arc de précipitation est décelé qui correspond à l'antigène V. Les autres constituants proviennent donc du sérum.

- Le même antigène V est également révélé par le Soudan III, colorant des lipoprotéines.

B - Enzymes.

- Par la technique de révélation de l'activité protéolytique décrite par Uriel (157), on peut mettre en évidence 4 taches principales après électrophorèse en gélose à pH 8.6. Elles correspondent aux antigènes IA, IB, IIA et III d'un extrait de muqueuse gastrique. Le sérum de cynocéphale ne possède pas d'activité protéolytique. L'étude détaillée des enzymes protéolytiques et de leurs précurseurs fait l'objet du second Chapitre de ce travail.

- Deux substrats des estérases carboxyliques ont été utilisés : le béta-naphtyl-acétate et l'acétate d'indoxyle.

Trois estérases hydrolysent le béta-naphtyl-acétate, alors que l'acétate d'indoxyle permet de révéler quatre zones d'activité estérasique. Une bande principale, qui est parfois dédoublée, se retrouve dans la zone de migration de l'albumine, les autres bandes sont dans la région des alpha-2 et béta-1 globulines. Dans les mêmes conditions de concentration, nous n'avons mis en évidence dans le sérum sanguin qu'une seule bande d'activité pour chacun des 2 substrats dans la zone des alpha-2 globulines.

Par immunoélectrophorèse, deux arcs de précipitation sont révélabes par l'indoxyl-acétate (fig. 11). L'arc à migration cathodique correspond à l'antigène V. Le deuxième arc présente deux courbures dont la partie la plus lente correspond à l'antigène II B et la partie la plus rapide a une mobilité de 1.1 .

- Cinq lacticodéshydrogénases ont été observées après électrophorèse sur gel de polyacrylamide (fig. 12). Elles sont numérotées, selon la nomenclature européenne, de 1 à 5 par ordre de mobilité décroissante. Elles diffèrent également par leur concentration (LD 1 > LD 2 > LD 3 > LD 4 > LD 5) et par leur résistance à la chaleur et à un cycle de congélation-décongélation. Ainsi, sur les préparations non lyophilisées et conservées quelques semaines, seules LD 1 et LD 2 peuvent être mises en évidence.

- L'activité catalasique des extraits de muqueuse gastrique est importante. Une partie de cette activité est due à la présence de contaminants sanguins; cependant l'image de la bande correspondante

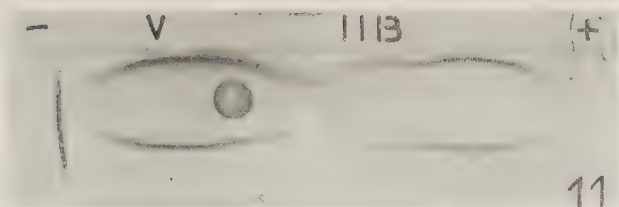


FIGURE N° 11 : Activité estérasique d'un extrait de muqueuse gastrique de Papio papio, vis-à-vis de l'acétate d'indoxyle.

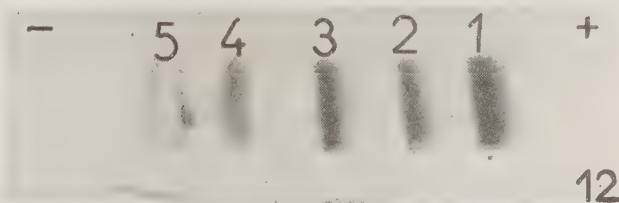


FIGURE N° 12 : Activité lactico-déshydrogénasique d'un extrait de muqueuse gastrique de Papio papio (sur gel de polyacrylamide-agarose).



FIGURE N° 13 : Mise en évidence, sur coupe de muqueuse gastrique, d'un anticorps anti-cellules bordantes dans le sérum d'un malade atteint d'anémie pernicieuse. Révélation avec un immunsérum fluorescent anti-globulines humaines (G x 170).

étant beaucoup plus importante que celle due à un hémolysat de sang, on peut penser qu'il existe une activité catalasique propre aux extraits de muqueuse gastrique.

- Deux zones d'activité peroxydasique peuvent également être observées dont l'une correspond à une peroxydase sanguine. La seconde bande d'activité a, sur gel de polyacrylamide, une mobilité supérieure à la première.

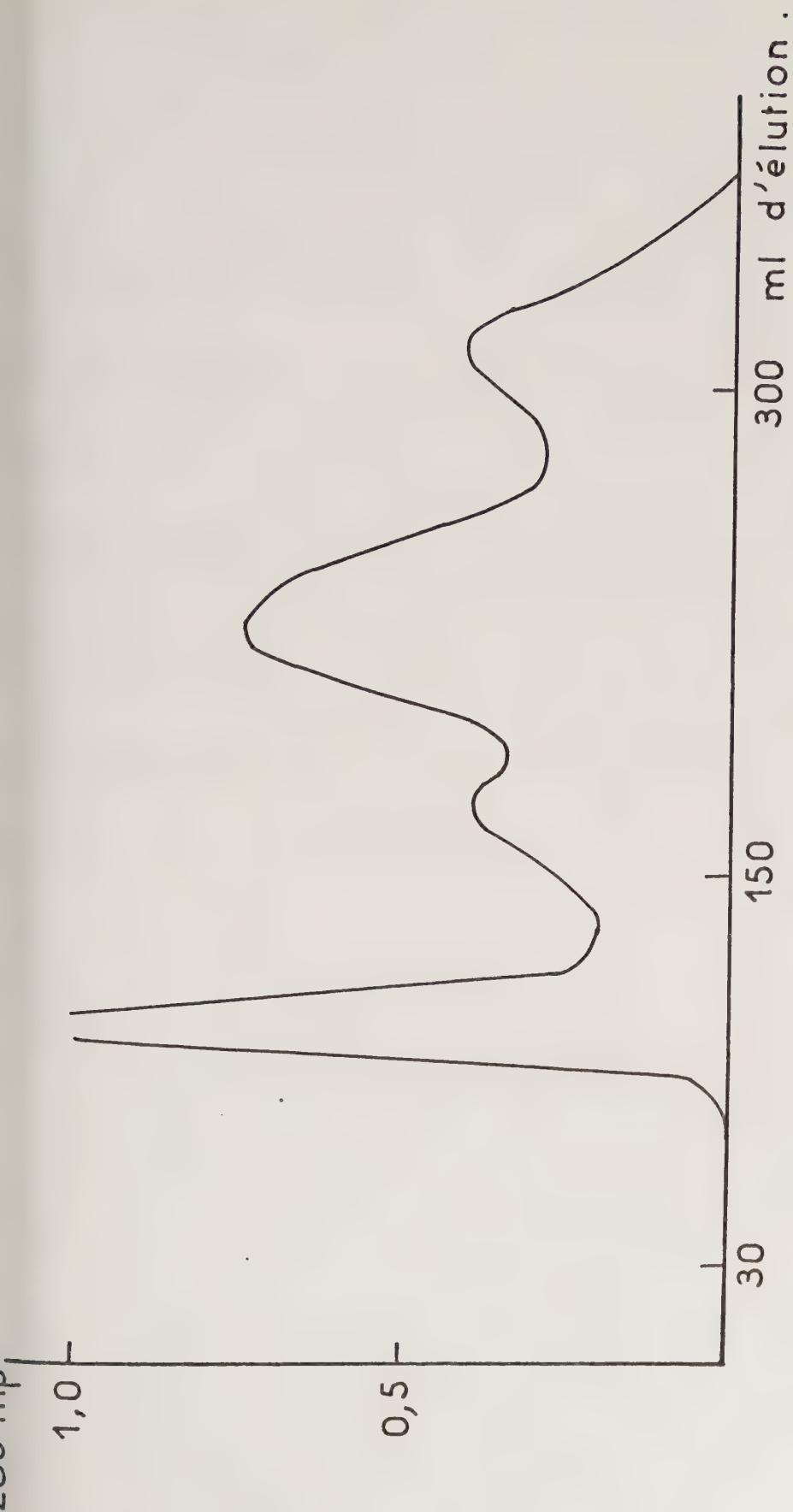
- Une activité de phosphatase acide est observée également sur gel de polyacrylamide. Une bande occupe la place de la sérumalbumine, la seconde est très proche du réservoir de départ.

3°- Résultats de la filtration sur gel de Sephadex G-200.

Comme le montre la figure 14, la filtration sur Sephadex G-200 permet l'élution de 4 pics, dont le premier est le plus important. Ils sont assez bien séparés, à l'exception des pics 2 et 3 qui présentent un chevauchement. Les fractions ont été soumises à l'immunoélectrophorèse en gélose pour identification. La répartition des antigènes est indiquée sur le tableau 2.

Seul l'antigène VI B, qui correspond à l'IgA, est mis en évidence dans le premier pic, qui est pourtant le plus important. Une quantité élevée des constituants de ce pic reste dans le réservoir de départ, probablement parce qu'ils sont de poids moléculaire très important.

Le 4ème pic ne contient aucune protéine qui puisse être mise en évidence par les colorants habituels (amidoschwartz, rouge Ponceau, bleu de Comassie) ou par l'une des réactions de caractérisation spécifiques employées. De plus, la réaction avec le Biuret est négative. Ce pic contient donc principalement des acides aminés et aussi quelques peptides de poids moléculaire et en concentration tels qu'ils ne réagissent pas avec le réactif du Biuret.



Filtration sur Sephadex G 200

d'un extrait de muqueuse gastrique de singe Papio papio.

FIGURE n° 14

	1er Pic	2ème Pic	3ème Pic
gènes sériques		IgG	Albumine
gènes gastriques on enzymatiques	VIB = IgA	IIB V	IV, VIA, VIIA, VIIB
rité protéolytique			IA, IB, IIA, III
rité estérasique		++	+
rité catalasique		++	
rité peroxydasique			++
rité phosphatasique tide			+

TABLEAU N° 2

4°- Antigènes spécifiques d'organes révélables à l'aide d'un auto-anticorps.

Les antigènes gastriques correspondant à un auto-anticorps ont été étudiés à l'aide de deux types d'immunsérums :

- sérums provenant de malades atteints d'anémie de Biermer et
- sérums provenant de lapins immunisés à l'aide d'extraits de muqueuse gastrique hétérologue,
- et par deux types de réaction : fixation du complément et immunofluorescence.

La réaction de fixation de complément permet de mettre en évidence un auto-anticorps thermo-résistant chez environ la moitié des animaux immunisés (126).

Nous avons démontré que ces anticorps étaient différents des auto-anticorps naturels décrits par Kidd et Friedewald (86). De plus, l'immunofluorescence permet de repérer l'antigène sur les coupes de muqueuse gastrique, après fixation à l'alcool méthylique pendant 3 minutes ou séchage dans un courant d'air.

a) antigène mucopolysaccharidique.

Cet antigène a été observé à l'aide de sérums de lapin anti-muqueuse gastrique de singe, de rat et de cobaye (126).

Il est situé dans le cytoplasme des cellules de l'épithélium de revêtement, et des cellules muqueuses du col. Cet antigène est spécifique de l'estomac, car les sérums ne réagissent pas sur d'autres parties du tractus digestif. Il a également été mis en évidence à l'aide de sérums anti-bactériens (anti-staphylocoque principalement). (127).

Par contre, l'antigène décelé avec les sérums anti-E.coli est différent de celui-ci car il se retrouve également dans le colon.

Nous avons démontré l'indépendance de cet antigène avec les substances A et B de groupe sanguin puisqu'il n'y a pas de modification de la fluorescence après absorption à l'aide de mélange de suspensions de globules rouges humains des groupes A et B.

Cet antigène est sécrété localement dans les cellules muqueuses des glandes fundiques. On peut distinguer l'aspect granuleux du cytoplasme des cellules fluorescentes. De plus, nous avons montré qu'il ne s'agissait pas d'une sécrétion exogène d'origine bactérienne en étudiant la répartition de l'antigène sur des coupes de muqueuse gastrique de fœtus à terme. L'aspect observé est identique à celui des coupes de tissu adulte.

b) antigène des cellules bordantes.

Cet antigène est localisé dans le cytoplasme des cellules bordantes. Celles-ci sont situées principalement dans le tiers moyen des glandes fundiques, quelques unes sont disséminées dans le fond des glandes au milieu des cellules principales. L'anticorps correspondant se trouve dans le sérum de certains lapins immunisés vis-à-vis de muqueuse gastrique de singe. Il y a tout lieu de penser (3) que c'est le même antigène qui est mis en évidence à l'aide de sérums de Biermériens (fig.13).

C H A P I T R E I I

LES PEPSINOGENES

1°- Mise en évidence

La technique de révélation de l'activité protéolytique de plaques soumises à l'électrophorèse en gélose met en évidence 4 zones principales d'activité. Nous les avons numérotées, suivant la nomenclature proposée par Kushner et coll (87) de I à IV par ordre de mobilité et de charge négative décroissantes par rapport au lévane et au constituant anodique d'un Pepsinogène cristallisé de référence à pH 5.6, ou à la sérumalbumine à pH 8.6. Le nombre de taches est identique, quel que soit le pH auquel est pratiquée l'électrophorèse (pH 5.6, 8.2, 8.6). Ces taches sont de superficie et d'intensité inégales. Cette hétérogénéité peut s'expliquer par des différences quantitatives entre les protéases ou par des pH optimaux d'activité différents.

A pH 5.6 la protéase P I, la plus rapide, est assez diffuse et s'étend vers l'anode. Les protéases P II et P III sont en général bien délimitées. La tache fournie par la protéase P IV est très arrondie et se divise, dans le plus grand nombre de prélèvements, en deux zones d'activité que nous dénommerons de l'anode à la cathode P IVa et P IVb (fig. 15).

A pH 8.2 ou 8.6 les taches fournies par les différentes protéases sont bien délimitées, en particulier P IV est très bien séparé de P III.

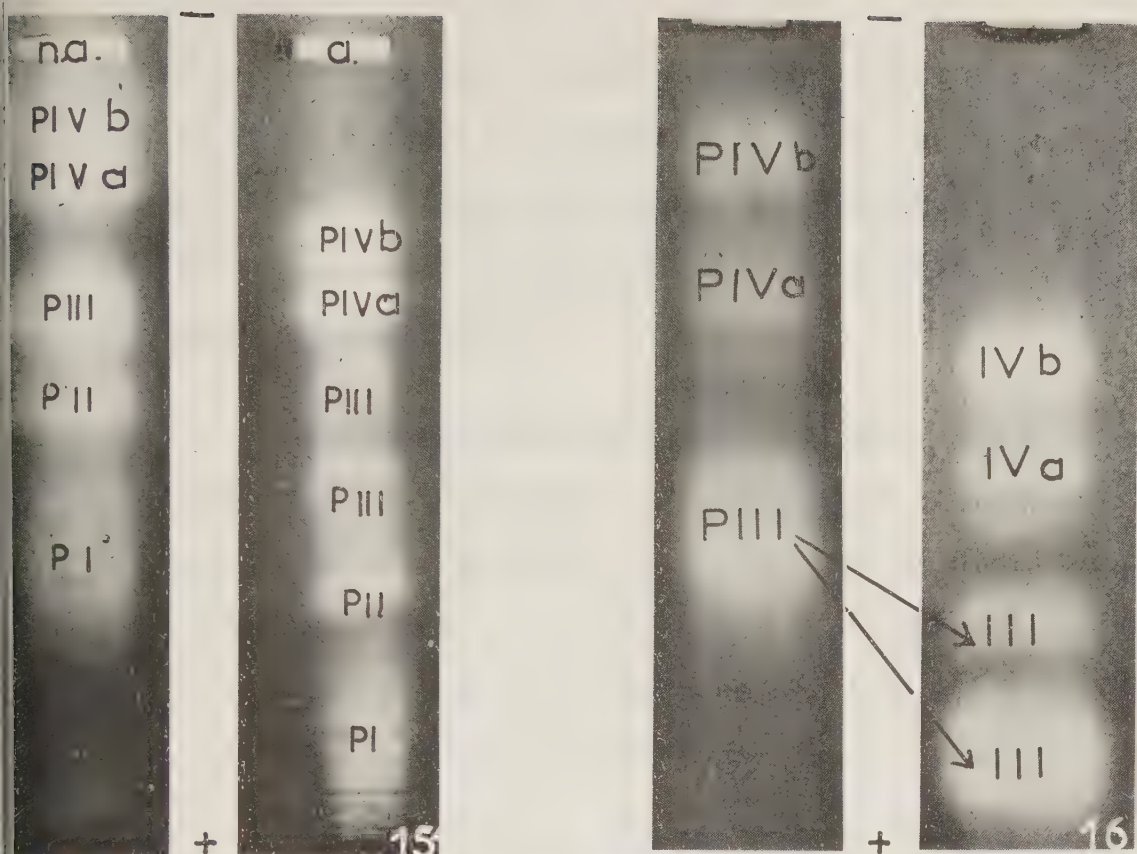


FIGURE N° 15 : Analyse électrophorétique (AE) en gélose à pH 5.6 d'extrait de muqueuse gastrique de singe Papio papio. A gauche, l'antigène non activé (na) avant la migration, et, à droite, l'antigène activé (a).

FIGURE N° 16 : AE d'une fraction éluée par chromatographie sur DEAE-cellulose. Elle représente, à gauche PIVa, PIVb et PIII avant activation et, à droite, les mêmes protéases après activation. Noter le dédoublement de PIII.

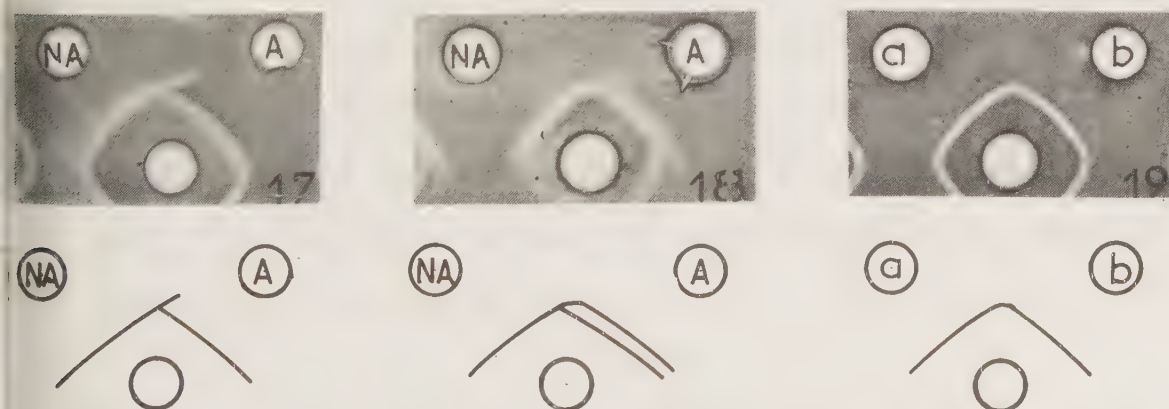


FIGURE N° 17 : Immunodiffusion en gélose (ID) à pH 5.6 d'un immun-sérum anti-muqueuse gastrique de singe vis-à-vis de PIV non activé (NA) et PIV activé (A). Noter la communauté antigénique partielle.

FIGURE N° 18 : ID du même immun-sérum vis-à-vis de PIII NA et PIII A. Noter le dédoublement de l'arc de précipitation après activation.

FIGURE N° 19 : ID du même immun-sérum vis-à-vis de PIVa (a) et PIVb (b). Noter l'identité antigénique.

Nous avons également soumis l'Edestine, protéine extraite du chénevis, à l'hydrolyse par le broyat de muqueuse gastrique après électrophorèse. Les résultats sont identiques et ces protéases sont également actives vis-à-vis des protéines animales et végétales.

L'analyse électrophorétique des coupes de muqueuse gastrique permet d'obtenir les mêmes images qu'avec le broyat de muqueuse non activé avant la migration; en particulier P I est bien séparé de P II et la protéase P IV est divisée en 2 fractions. Nous avons effectué cette épreuve sur une quinzaine d'estomacs dont les diagrammes sont superposables.

A pH 2, il y a transformation du pepsinogène en pepsine. La réaction est auto-catalytique. Des polypeptides basiques sont détachés, parmi lesquels un inhibiteur de la pepsine. Cet inhibiteur reste attaché à la molécule aux pH supérieurs à pH5.0, ce qui explique que la réaction ne soit autocatalytique qu'aux pH inférieurs. Au point de vue électrophorétique, la transformation se traduit par une augmentation de la mobilité de tous les constituants. Les deux taches qui correspondent à P IV sont bien séparées, le plus souvent P IVb a une intensité supérieure à celle de P IVa. La tache unique de pepsinogène P III est divisée en deux zones d'activité (fig. 16).

A pH 5.6, les mobilités relatives sont respectivement de :

Extrait de muqueuse non activé		Extrait de muqueuse activé
1,06	P I	1,36
0,86	P II	1,13
0,72	P III	1,02-0,81
0,45	P IV a	0,67
0,36	P IV b	0,58

Par immunoélectrophorèse, à l'aide d'immunsérum de lapin anti-muqueuse gastrique totale, épuisé avec du sérum de singe normal, on peut observer trois lignes de précipitation caractéristiques sur les extraits non activés et activés : (fig.20)

a) Extraits non activés : la première ligne est très courbée, elle entoure le réservoir de départ et correspond à P IV. La seconde ligne, plus fine correspond à P III et coupe la ligne précédente et la troisième ligne. Cette dernière s'étend vers l'anode. A la moitié de son parcours, elle s'infléchit et présente une deuxième courbure. La première partie correspond à P II et la seconde à P I.

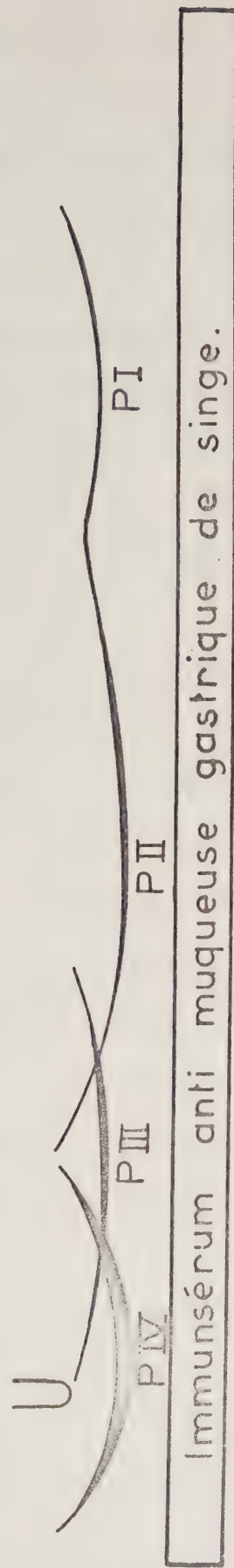
b) Extraits activés : les lignes de précipitation sont identiques dans leur aspect général, mais elles sont décalées vers l'anode car la mobilité électrophorétique des constituants est augmentée.

2°- Caractérisation des pepsinogènes.

a) Séparation.

Nous avons séparé les différents pepsinogènes par chromatographie sur échangeurs d'ions. Nous n'avons pas utilisé le

— Protéases
non activées.



Protéases
activées.

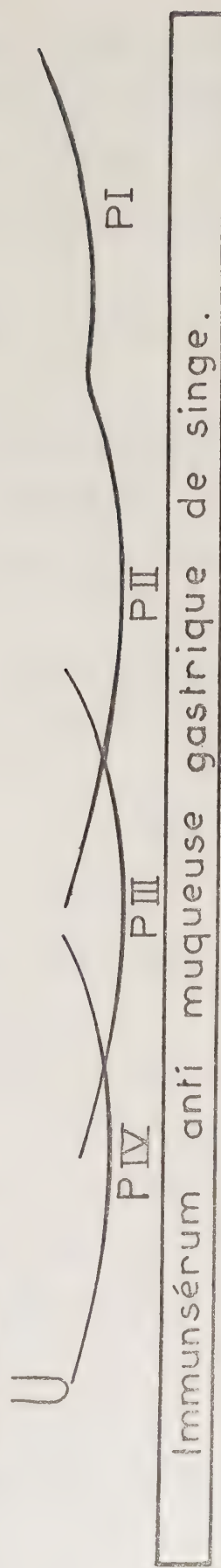


FIGURE N° 20

relargage au sulfate d'ammonium, comme étape préliminaire. En effet, une fraction trop importante de pepsinogènes reste dans le surnageant après précipitation à 0.45 ou même à 0.60 de saturation, conditions le plus souvent préconisées par d'autres groupes d'auteurs (67).

La chromatographie sur DEAE-Sephadex, en tampon acétate à pH 5.0 a donné les résultats suivants : (fig. 21)

- le premier pic d'activité protéolytique est élué avec NaCl 0.08 M. Dans ces conditions, la protéase P IV est localisée dans ce seul pic. Son activité protéolytique varie de 350. à 400.10^{-3} UP/ml.
- le deuxième pic contient la plus grande partie de l'activité protéolytique, de 1.000. à $1.200.10^{-3}$ UP/ml. Il contient les protéases P III et P II.
- le troisième pic, de faible activité (environ 50.10^{-3} UP/ml) est élué avec un tampon contenant du NaCl 0.6 M.

La chromatographie sur DEAE-cellulose, en tampon acétate à pH 5.4, a donné les résultats suivants: (fig. 22)

- un gradient de NaCl de 0.0 M à 0.10 M permet l'élution de deux pics : le premier correspondant à 0.035 M et le second à 0.08 M de NaCl. Les activités protéolytiques atteignent respectivement 150. à 300.10^{-3} UP/ml d'éluat pour le premier pic, et 40. à 100.10^{-3} UP/ml pour le deuxième pic. L'analyse électrophorétique nous a permis d'identifier P IVb dans le premier pic et P IVa dans le second.
- un troisième pic est élué avec du NaCl 0.16 M et contient principalement P III et des traces de P II. L'activité protéolytique

FIGURE N° 21 : Courbe représentant la séparation des Pepsinogènes sur DEAE-Sephadex en tampon acétate 0.1 M, pH 5.0, selon la technique de l'élution par étapes. Les changements de tampon et les molarités de NaCl sont indiqués d'une flèche. Colonne de 25cm.x 2cm., fractions de 10ml.

ion.

FIGURE N° 22 : Courbe représentant la séparation des Pepsinogènes sur DEAE-cellulose en tampon acétate 0.1 M, pH 5.4
Même légende.

I.P. 10-3

150

00

on.

FIGURE N° 21 : Courbe représentant la séparation des Pepsinogènes sur DEAE-Sephadex en tampon acétate 0.1 M, pH 5.0, selon la technique de l'élution par étapes. Les changements de tampon et les molarités de NaCl sont indiqués d'une flèche.
Colonne de 25cm.x 2cm., fractions de 10ml.

FIGURE N° 22 : Courbe représentant la séparation des Pepsinogènes sur DEAE-cellulose en tampon acétate 0.1 M pH 5.4
Même légende.

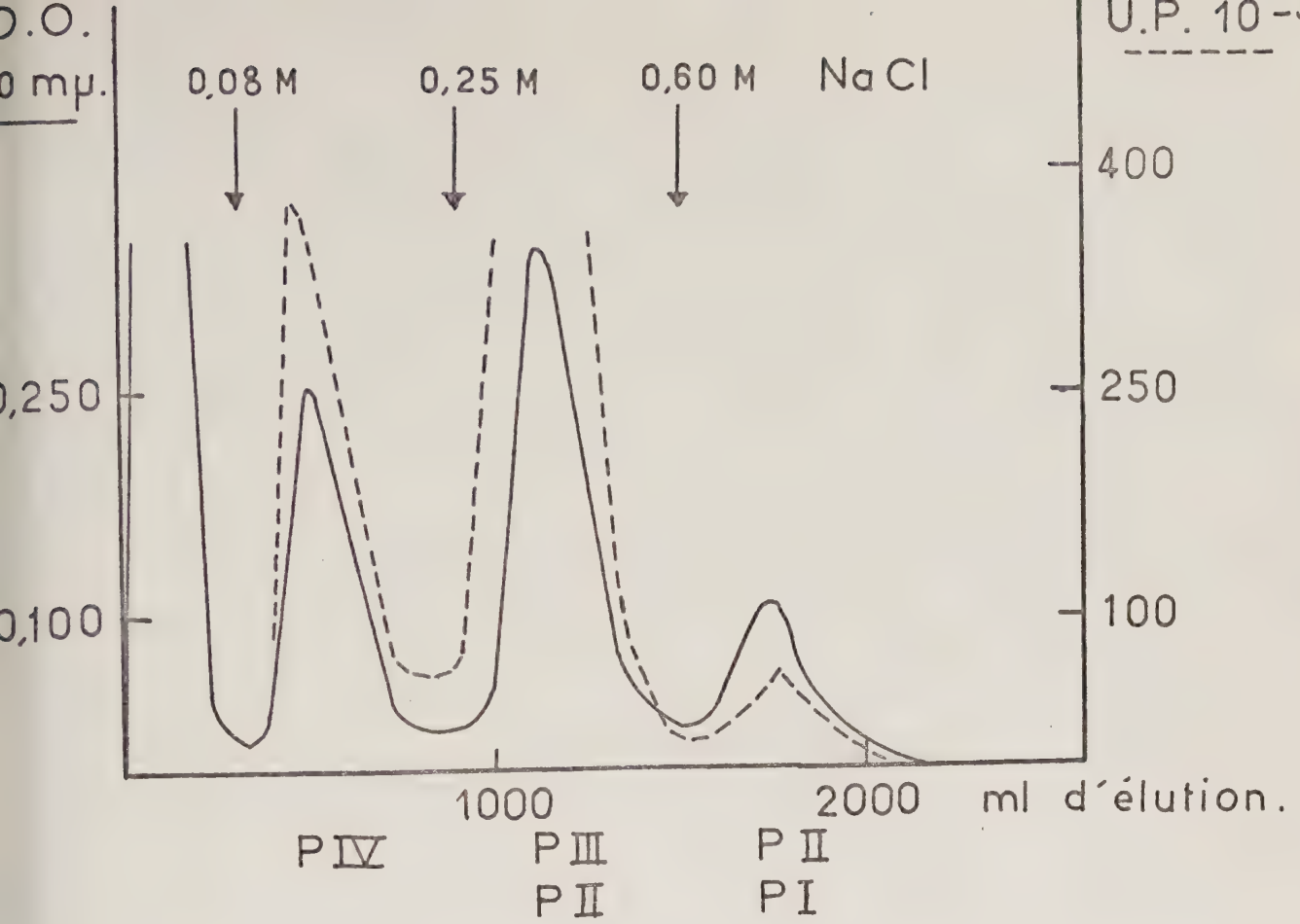


FIGURE N° 21

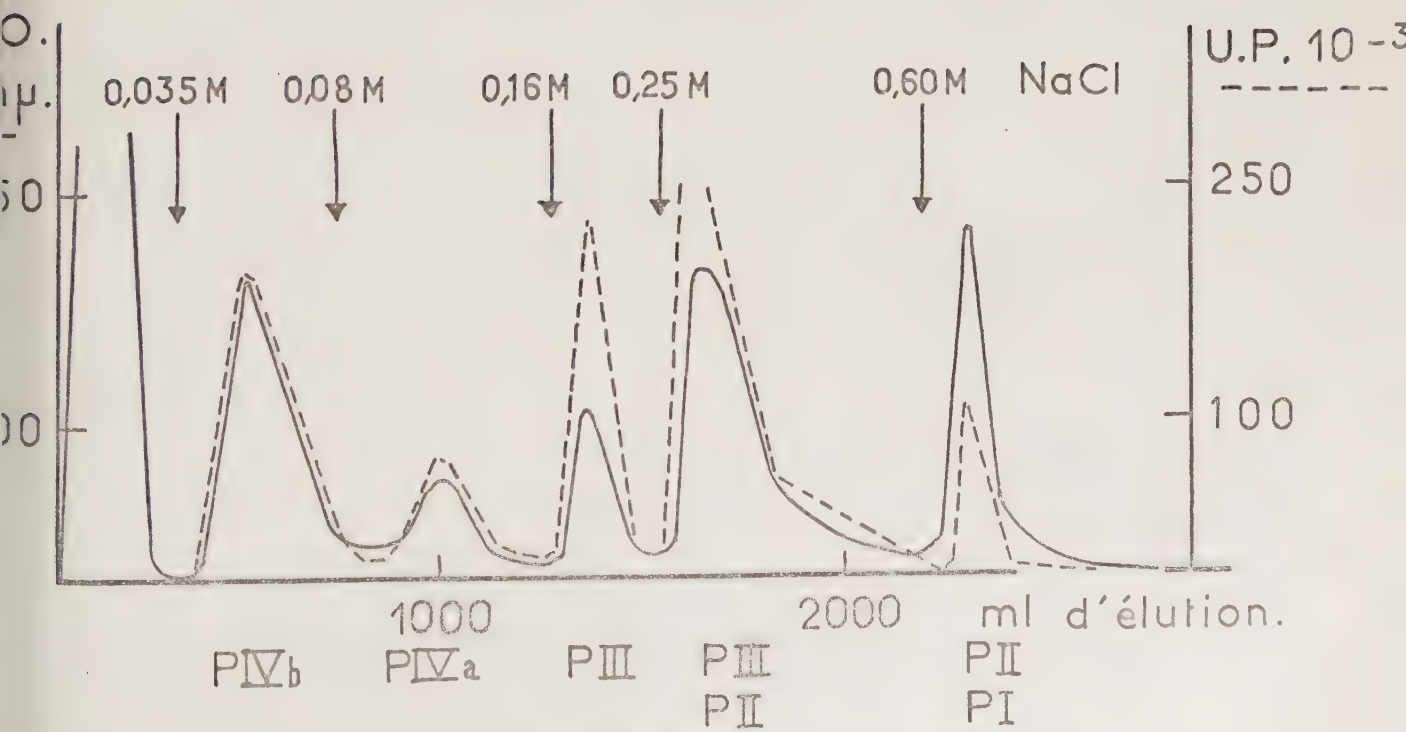


FIGURE N° 22

est comprise entre 200. et 300. 10^{-3} U P/ml.

Le passage de NaCl 0,25 M permet d'éluer un pic d'activité plus importante, de 300. à 600. 10^{-3} U P/ml. Il contient P III et PII.

Le dernier pic est élué avec NaCl 0,60 M, il renferme P I, et aussi des traces de P II; son activité protéolytique varie entre 50. et 150. 10^{-3} U P/ml.

Le passage sur DEAE-cellulose à pH 5.4 permet de séparer les deux sous-fractions de P IV, ce qui n'est pas possible sur le DEAE-Sephadex à pH 5.0. P IV est toujours bien séparé des autres pepsinogènes. Sur la DEAE-cellulose, on obtient avec le NaCl 0,16 M une solution renfermant surtout le pepsinogène P III. Mais il est difficile d'obtenir une préparation de P III non contaminée par P II.

b) propriétés des pepsinogènes

Choix de la technique de mesure.

Nous avons pratiqué la mesure de l'activité protéolytique des protéases, selon la technique originale d'Anson avec l'hémoglobine comme substrat, et selon une adaptation de la technique de Lapresle et Webb avec la sérumalbumine bovine.

A titre d'exemple, nous avons comparé sur la figure 23 les résultats obtenus à l'examen des fractions éluées de l'une des colonnes de DEAE-cellulose.

Par les deux techniques, il n'est pas possible de mettre en évidence d'activité protéolytique avant le début du gradient.

Par digestion de l'hémoglobine, l'activité protéolytique maximale se retrouve dans le troisième pic, comme avec la S.A.B.

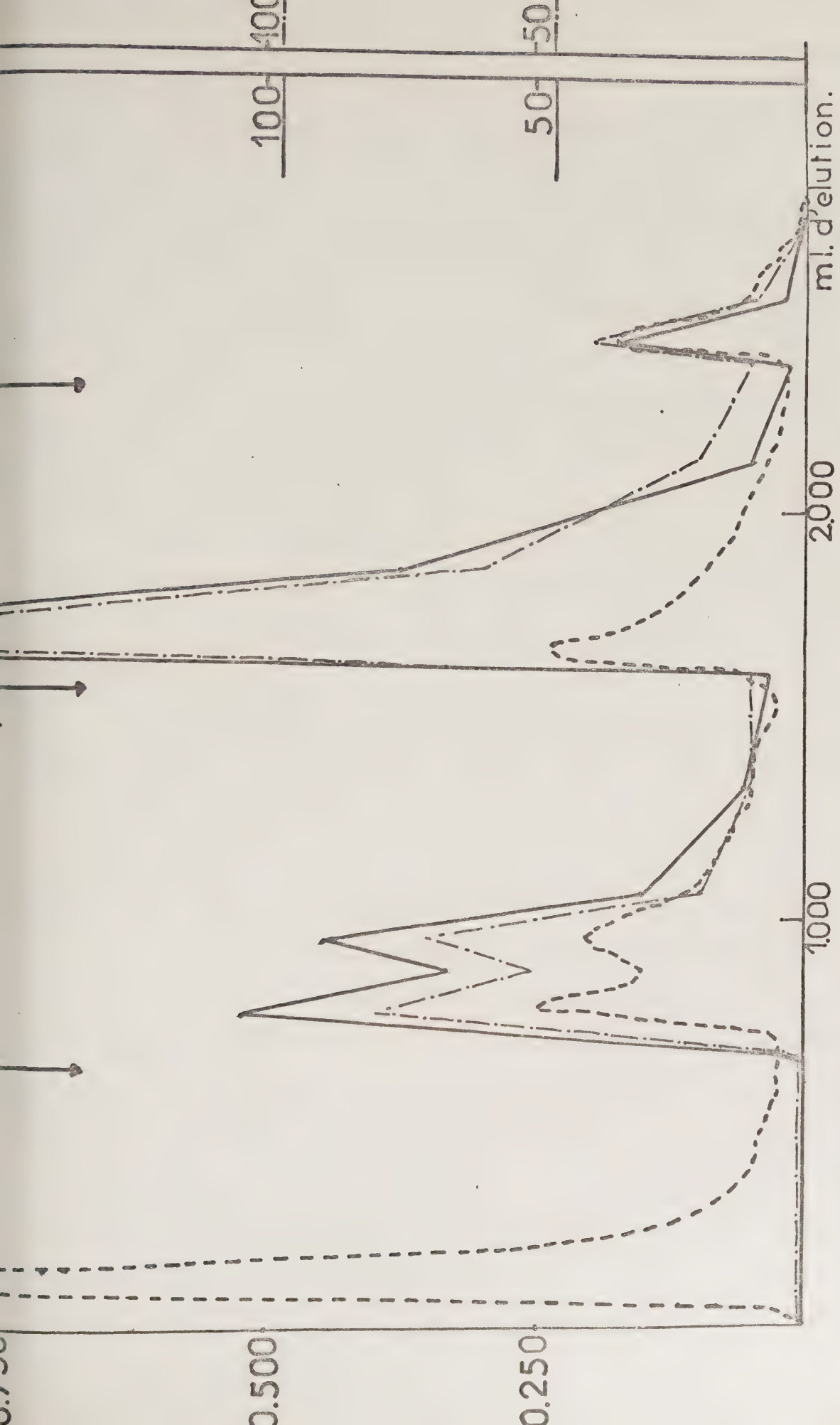


FIGURE N° 23

RESULTAT DE L'EXAMEN COMPARATIF DES DEUX TECHNIQUES DE MESURE DE L'ACTIVITE PROTEOLYTIQUE

PAR DIGESTION DE L'HEMOGLOBINE (Technique d'ANSON) ET PAR

DIGESTION DE LA S.A.B. (Technique de LAPRESLE et WEBB)

Avec les deux méthodes de dosage, l'activité du premier pic est supérieure à celle du second, cette dernière étant elle-même supérieure à celle du quatrième pic. Entre chaque changement de tampon, le retour aux environs de 0.0 de la courbe d'absorption des protéines à 280 m μ est accompagné d'un retour à des valeurs très faibles de l'activité protéolytique.

Le tracé des deux courbes étant très voisin l'un de l'autre, nous avons estimé que nous pouvions utiliser indifféremment l'une ou l'autre de ces deux méthodes.

Dans la pratique, nous avons utilisé la technique de mesure par digestion de la sérumalbumine bovine. En effet l'utilisation de la SAB présente, par rapport à l'hémoglobine, certains avantages.

Elle est aisément mise en solution, même en concentration importante et dans de larges zones de pH. De plus, comme les produits de dégradation de la SAB peuvent être mis en évidence par le Biuret, il était logique de l'utiliser d'autant plus qu'il procure des témoins "blancs" négatifs avec des extraits tissulaires.

La mesure de l'activité protéolytique des différentes protéases séparées sur DEAE-cellulose vis-à-vis de la SAB à des pH échelonnés de 1.5 à 4.0 n'a pas permis de mettre en évidence de différence significative dans leur comportement (fig.24). Pour chacune des protéases isolées, le pH optimum d'activité est voisin de pH 2.0. Les courbes d'activité de P IVb et P IVa sont identiques. La zone optimale d'activité est plus réduite pour ces 2 protéases que pour P III, P II et P I.

D.O. 555 mμ

- 69 -

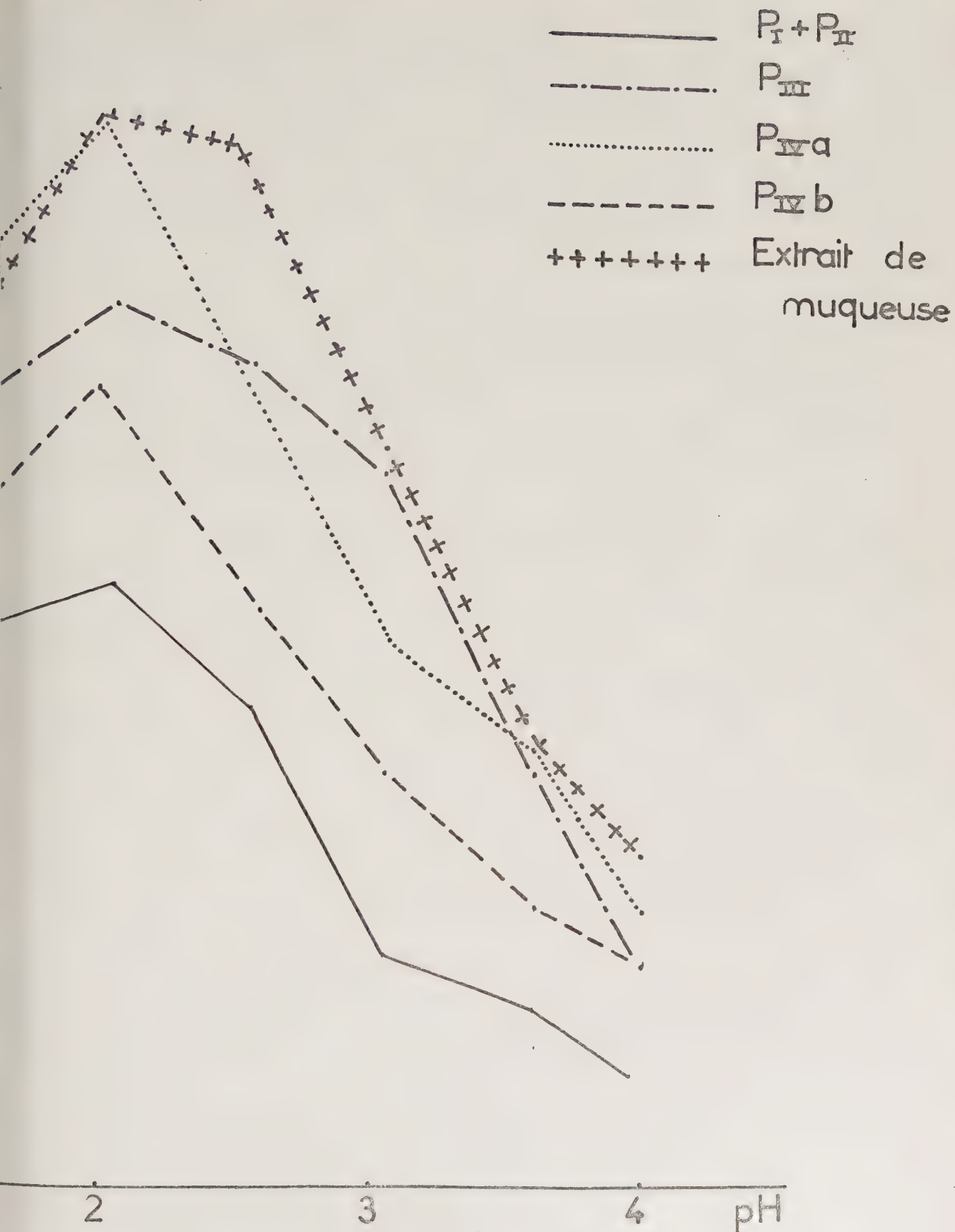


FIGURE N° 24

MESURE DE L'ACTIVITE PROTEOLYTIQUE, VIS-A-VIS DE LA S.A.I., A DIFFERENTS pH, DES PROTEASES SEPARÉES SUR DEAE-CELLULOSE

Les courbes d'activité de ces derniers se rapprochent plus de la courbe d'activité globale de l'extrait de muqueuse gastrique pour lequel nous avons établi un pH optimum voisin de pH 2.0 (fig.24). Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus lors de l'étude électrophorétique. Après la migration effectuée à pH 5.6, si l'on incube les plaques dans la S.A.B. à 0,3% tamponnée à pH 1.5, 2.0, 2.5, 2.9, 3.4 et 4.1 l'on peut observer une diminution régulière de l'activité protéolytique à partir de pH 2.9 .

Par contre, après électrophorèse à pH 8.2, puis incubation aux pH égaux ou supérieurs à pH 3 les seules protéases actives sont P I et P IV.

L'activité électrophorétique a également été utilisée comme méthode de mise en évidence de la sensibilité des protéases aux alcalis.

On amène le pH des solutions d'extrait de muqueuse gastrique, activés ou non activés, à pH 9.0 à l'aide de soude 0.5 N et 0.1 N . Après 15 minutes de contact à la température du Laboratoire, les antigènes sont soumis à l'électrophorèse. Ce traitement est sans influence sur les pepsinogènes de la muqueuse gastrique, qui sont encore susceptibles d'être activés, puis de digérer la S.A.B.

Par contre, les extraits activés sont dénaturés de façon irréversible, par la soude, et ils sont inactifs vis-à-vis de la S.A.B.

Nous avons étudié les rapports antigéniques existant entre les différentes protéases. Par immunoélectrophorèse

les immunsérums anti-muqueuse gastrique sont actifs vis-à-vis des protéases activées. Par immunodiffusion en gélose, on peut mettre en évidence la parenté antigénique entre la forme activée et non activée d'une protéase (fig. 17).

Sur la figure 18 qui représente la réaction de l'anticorps anti-muqueuse gastrique vis-à-vis de P III, on peut observer le dédoublement de l'arc de précipitation vis-à-vis de la forme activée. Ceci correspond à l'aspect observé en électrophorèse où P III est divisé en deux sous-fractions (fig. 16). Nous avons observé l'identité antigénique de P IVa et P IVb (fig. 19) ainsi que de P I et P II.

Les expériences d'inhibition des anticorps confirment l'existence de communautés antigéniques entre les formes activées et non activées. L'anticorps absorbé, avec la forme activée ou non activée, est inactif vis-à-vis de la forme native. Par contre, l'anticorps absorbé, avec la forme activée puis dénaturée par la soude, reste actif vis-à-vis des pepsinogènes.

3°- Communautés antigéniques entre les pepsinogènes de différentes espèces.

Deux lapins (499 et 500) ont été immunisés à l'aide de pepsinogène de porc purifié et cristallisé. (125). Le titre de l'anticorps précipitant a atteint 1/32 après la seconde injection de rappel. Il existe - ainsi que le montrent l'électrophorèse et l'immunoélectrophorèse - deux constituants dans cette préparation (fig.25). Ils sont tous les deux doués d'activité protéolytique vis-à-vis de la S.A.B. après électrophorèse et ils sont tous les deux antigéniques ; l'absence de pepsine a été vérifiée par

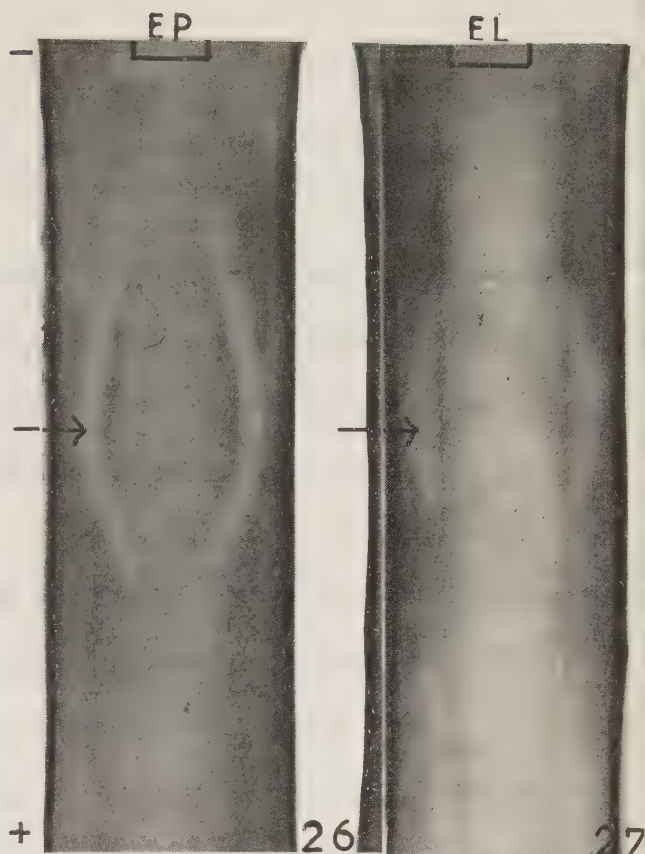
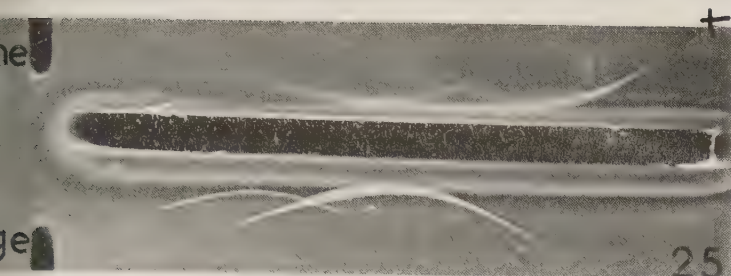


FIGURE N° 25 : AIE à pH 5.6 du sérum de lapin n° 499 anti-pepsinogène de porc (Pge) vis-à-vis de Pge et de pepsine de porc (Pne).

FIGURES N°s 26 et 27 : AIE à pH 5.6 du sérum n° 499 vis-à-vis d'extrait de muqueuse gastrique de Papio papio (EP) et de lapin (EL). Révélation de l'activité protéolytique.

FIGURE N° 28 : AIE de deux immunsérums anti-muqueuse gastrique de singe vis-à-vis de Pge. Révélation de l'activité protéolytique.



FIGURE N° 29 : ID en gélose à pH 7.4 du sérum n° 499 vis-à-vis de doses décroissantes de Pge en 1, 2, 3, 4, et de EP en 5 et 6. Révélation de l'activité protéolytique.

l'absence de coagulation du lait à pH 5.3. De plus, les lapins n'ont pas élaboré d'anticorps actif vis-à-vis des protéines sériques de singe ou de porc.

Il existe aussi, dans les deux sérums de lapin anti-PgP, un anticorps actif sur le broyat de muqueuse gastrique de singe (fig.26) et de lapin isologue et autologue (fig.27). Par sa mobilité électrophorétique, l'arc de précipitation correspond au constituant le plus anodique du PgP.

Après absorption du sérum n° 499, à l'aide d'extrait de muqueuse gastrique de lapin on observe le raccourcissement de l'arc de précipitation, conséquence de la diminution de l'anticorps anti-PgP.

L'absorption, à l'aide de muqueuse gastrique de singe, provoque une disparition des deux arcs (sérum 499) ou une diminution du précipité (sérum 500).

Nous avons effectué les épreuves inverses d'absorption de quatre sérums de lapin anti-muqueuse gastrique de singe à l'aide de PgP. L'arc de précipitation vis-à-vis de PIV n'est pas modifié par l'absorption; par contre, l'intensité des arcs correspondant à PII et à PIII sont diminués. De plus, ces mêmes immunosérums présentent, pour le PgP, deux arcs de précipitation (fig.28), dont le tracé est assez semblable à celui des arcs obtenus lors de la réaction des sérums anti-PgP vis-à-vis de l'antigène homologue.

L'immunodiffusion apporte la preuve d'une communauté antigénique entre le PgP et la muqueuse gastrique de singe. Sur la figure 29 qui montre la réaction du sérum n° 499 vis-à-vis de ces deux antigènes, on observe la coalescence de la ligne de précipitation de l'un des constituants de PgP avec un antigène de la muqueuse gastrique de singe.

Cet ensemble de résultats nous amène à conclure que les deux constituants du PgP présentent des déterminants antigéniques communs avec les pepsinogènes de singe, et plus particulièrement P II et P III.

Nous avons utilisé ces propriétés pour mettre en évidence les sites de production du pepsinogène dans les cellules de la muqueuse gastrique à l'aide d'anticorps spécifiques.

4°- Localisation des pepsinogènes.

La localisation des pepsinogènes a été étudiée parallèlement par immunofluorescence, grâce à la réaction indirecte de Coons, et à l'aide de techniques histologiques et histochimiques.

Ces dernières ont servi principalement à repérer les diverses catégories cellulaires des glandes fundiques, à l'exception des cellules argentaffines. En effet, il n'existe pas de coloration réellement spécifique des pepsinogènes.

Les cellules muqueuses du col sont situées dans la partie supérieure de la glande. Leur cytoplasme granuleux est coloré par le réactif de Schiff, mais de façon moins intense que les cellules de l'épithélium de revêtement.

Les cellules bordantes sont réparties sur toute la hauteur des glandes, leur nombre diminue au fur et à mesure que l'on se rapproche au fond des glandes. Ce sont des cellules assez volumineuses au noyau arrondi. Le cytoplasme est très riche en mitochondries, ce qui est probablement lié à la sécrétion d'HCl et qui a pour conséquence une affinité des cellules bordantes pour les colorants acides.

La répartition dans les cellules principales est à

l'inverse de celle des cellules bordantes ; elles sont localisées essentiellement dans le fond des tubes glandulaires, le long de la musculaire-muqueuse (fig. 30). Leur mise en évidence a été effectuée à l'aide des colorations EOBT et PBA. Les noyaux sont repoussés contre la membrane cellulaire. Les granulations cytoplasmiques ont une grande affinité pour le bleu de toluidine et pour le permanganate-bleu alcian (fig. 31 et 32).

La caractérisation histochimique des résidus tryptophane des produits de sécrétion effectuée par la technique d'Adams permet de mettre en évidence une activité sécrétrice importante, ce qui se traduit par la coloration bleue des granulations.

Les réactions d'immunofluorescence ont été pratiquées à l'aide de sérums anti-PgP absorbés avec un mélange de globules rouges de différents singes et sur des coupes de muqueuse gastrique fundique fixées dans des vapeurs d'acétone.

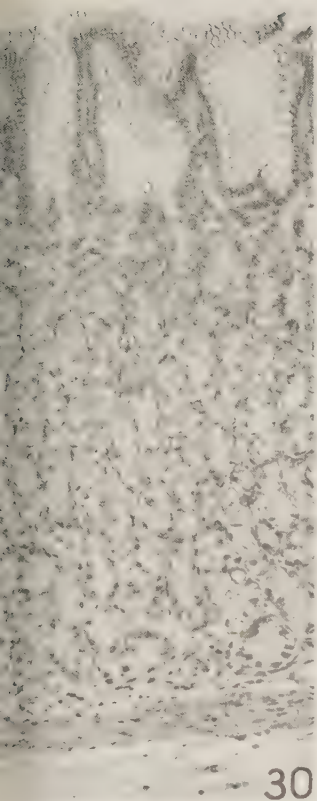
La fluorescence est localisée aux granulations cytoplasmiques des cellules principales dans le tiers inférieur de la muqueuse (fig. 33 et 34). On reconnaît très aisément leur noyau noir, repoussé contre la basale, ainsi que les cellules bordantes les accompagnant qui ne sont pas marquées par le fluorochrome.

Cet aspect correspond à celui de grains de sécrétion, colorés par la méthode d'Adams en particulier. Aucune fluorescence n'est décelable sur les cellules bordantes, ni sur les cellules à mucus du col.

L'examen en immunofluorescence des sérums anti-PgP, vis-à-vis de coupes de pancréas, rate, glandes salivaires, oesophage, intestin grêle, colon de singe Papio papio, ne nous a

permis de mettre en évidence d'anticorps actif sur l'un ou l'autre de ces organes.

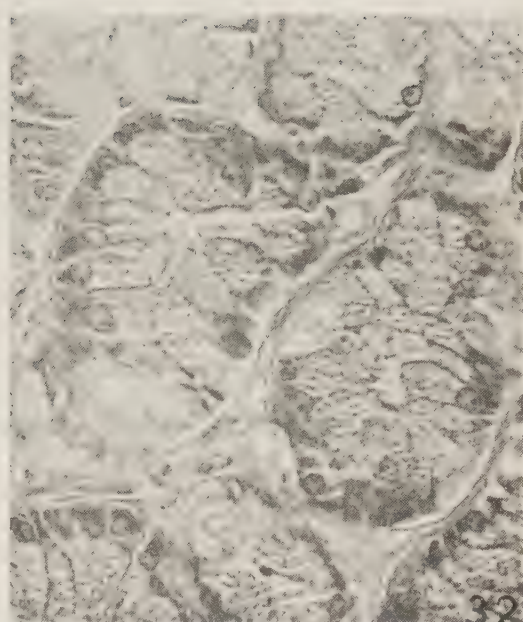
Etant donné la concordance des résultats obtenus par les diverses méthodes employées, il est raisonnable de conclure que les pepsinogènes sont strictement localisés dans les cellules principales du fundus.



30



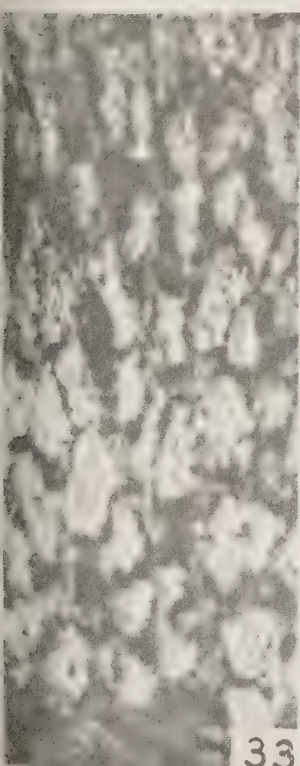
31



32

FIGURE N° 30 : Coupe de muqueuse gastrique fundique de Papio papio colorée à l'hémalum-éosine (G x 90)

FIGURES N°s 31 et 32 : Coupe de muqueuse gastrique fundique de Papio papio colorée par le PBA (G x 90 et G x 580)



33



34

FIGURES N°s 33 et 34 : Coupe de muqueuse gastrique fundique de Papio papio traitée avec le sérum anti-Pge de porc 499 et révélée avec un sérum fluorescent anti-globulines de lapin (G x 170 et G x 660)

C H A P I T R E I I I

LE FACTEUR INTRINSEQUE

1°- Mise en évidence.

Le facteur intrinsèque (I.F.) ou facteur anti-anémique de Castle possède deux propriétés fondamentales. Il est capable de se lier à la vitamine B12 et de promouvoir l'absorption de celle-ci par les récepteurs intestinaux de la muqueuse iléale. La mise en évidence du facteur intrinsèque est facilitée par l'utilisation de la première propriété. Le couplage de la vitamine B12 marquée (ou cyanocobalamine Co 58) au facteur intrinsèque est instantanée, et la réaction est équimoléculaire.

Nous avons mesuré la capacité de liaison de la vitamine B12 aux diverses préparations de facteur intrinsèque ou d'extraits de muqueuse gastrique. La courbe de la figure 35 montre - à titre d'exemple - les résultats obtenus avec un extrait brut de muqueuse fundique de singe Papio papio.

La capacité de liaison se définit comme la quantité de vitamine B12 susceptible de s'unir à 1 mg. d'antigène :

- estomacs de singe (pool)..... 12,8 ng B12/mg.
- estomacs de porc (individuels)..... 10 à 20 ng/mg.
- préparation I.F. Wes 942..... 0,5 µg/mg.
- préparation I.F. NBC..... 1 µg/mg.

Un constituant fixant la vitamine B12, de mobilité 0.34 est mis en évidence dans l'extrait de muqueuse gastrique de Papio papio par immunoélectrophorèse à pH 8.6 (fig. 36).

Fixation de la Vitamine B₁₂ par un extrait de muqueuse gastrique de singe

%age de B₁₂ liée
(100% = 5ng)

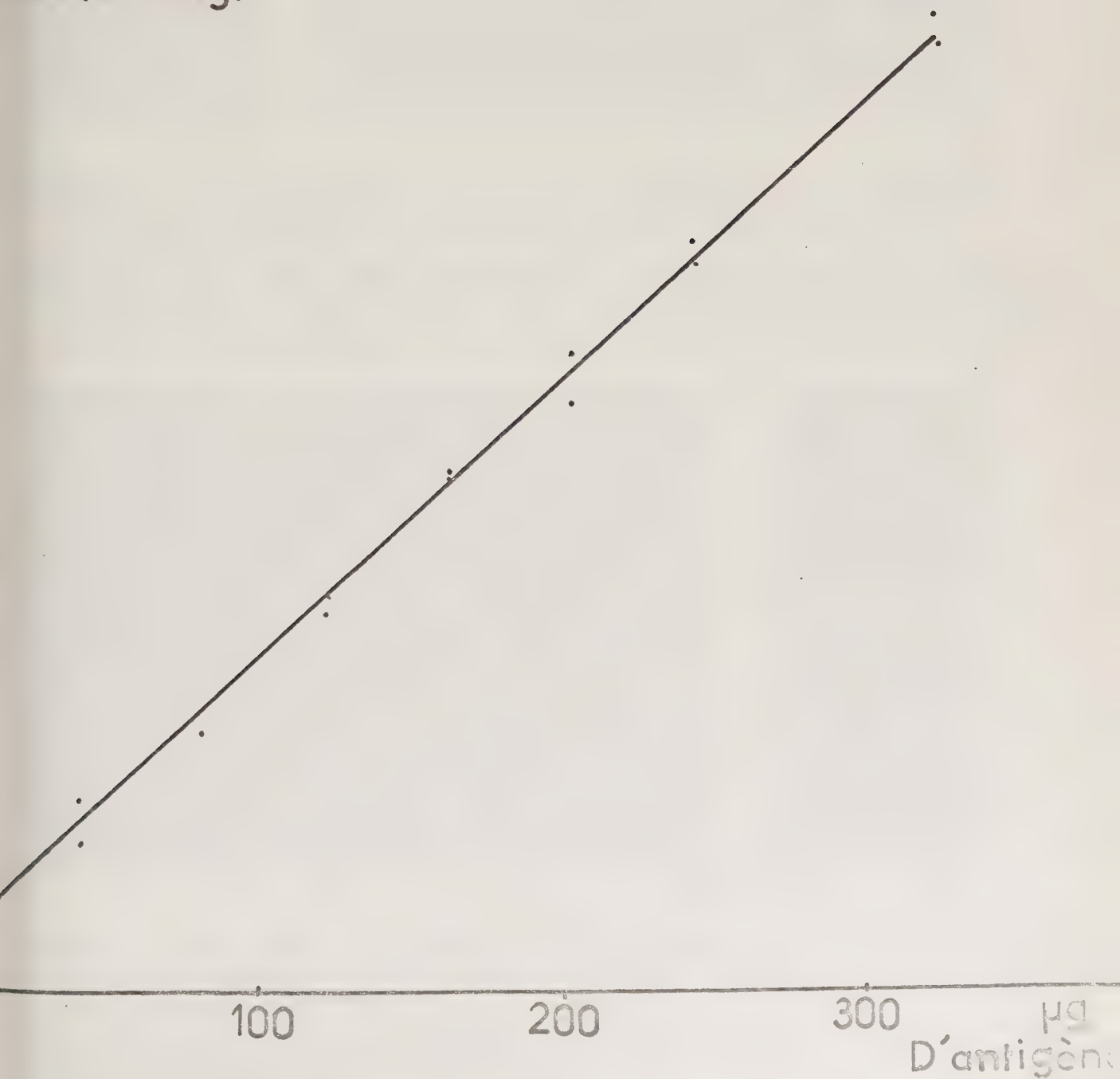


FIGURE N° 35

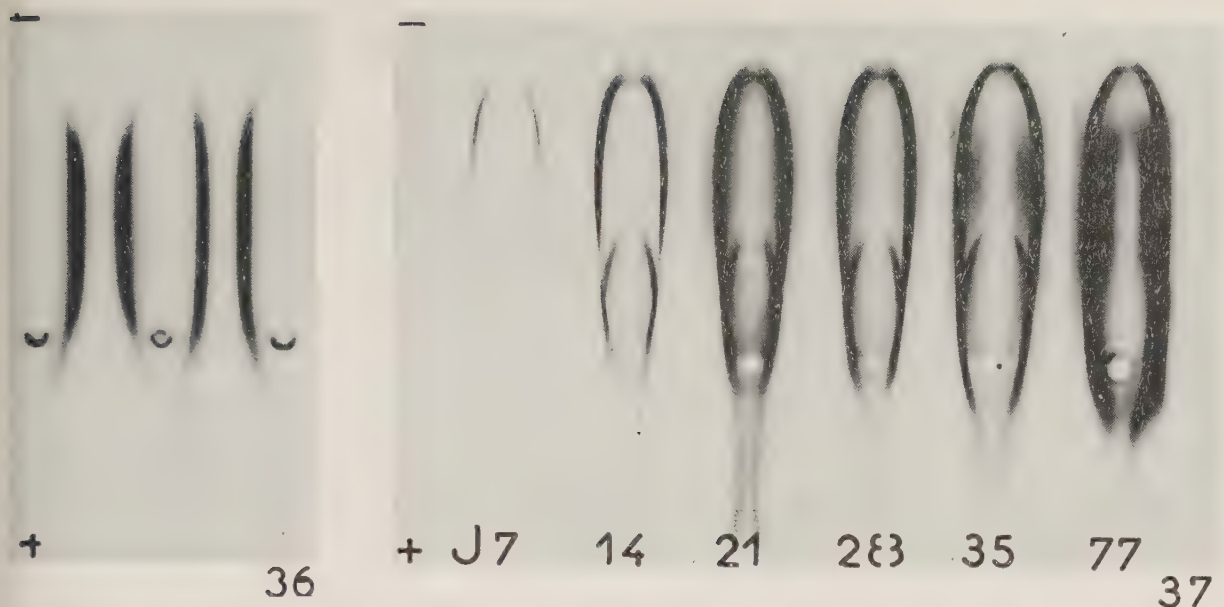


FIGURE N° 36 : Autoradio-AIE de deux immunsérums de lapin anti-muqueuse gastrique de singe vis-à-vis d'un extrait de muqueuse gastrique de singe couplé à de la vitamine B12-Co 58.

FIGURE N° 37 : Evolution, au cours de l'immunisation, des anticorps anti-facteur intrinsèque de porc (I.F.) du sérum du lapin n° 622. Migration des sérums. Dans les gouttières, dépôt de sérum antiglobulines de lapin mélangé à un volume égal de complexe I.F.B12-Co 58.

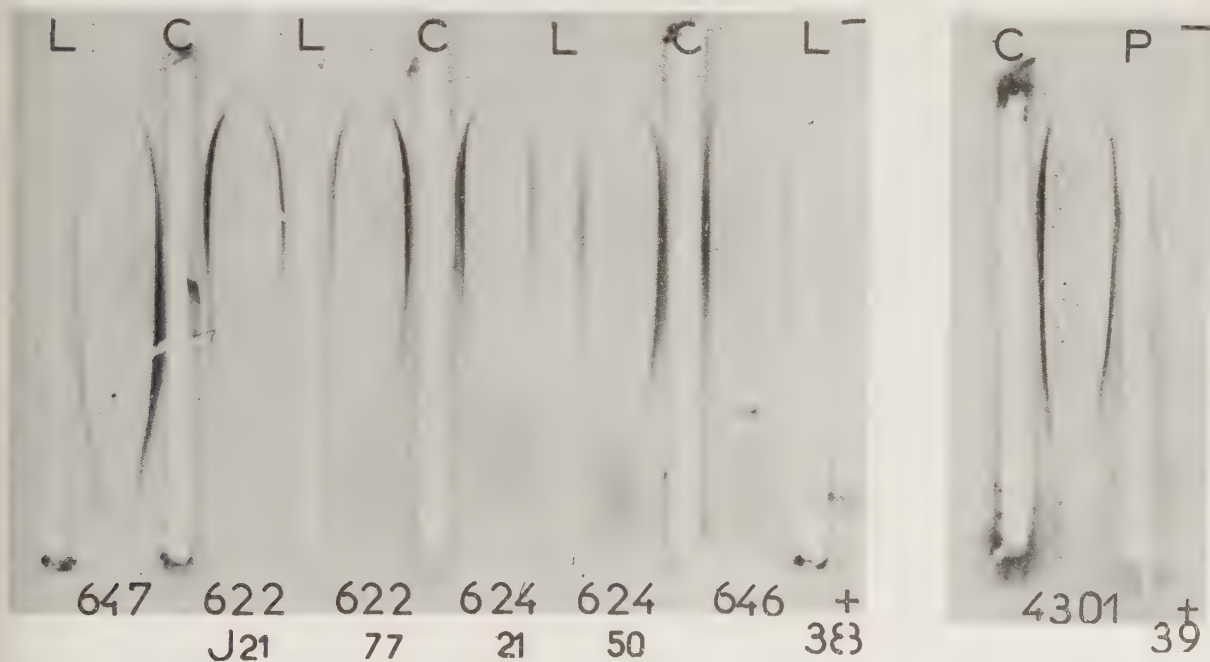


FIGURE N° 38 : Mise en évidence des anticorps anti-I.F. de singe (C) chez les lapins n°s 622, 624, 646 et 647, et anti-I.F. de lapin (L) dans le sérum du lapin n° 622 dès le 21° jour de l'immunisation.

FIGURE N° 39 : Mise en évidence d'anticorps anti-I.F. dans le sérum 4301 (provenant d'un Biermérien) vis-à-vis d'I.F. de singe (C) et d'I.F. de porc (P).

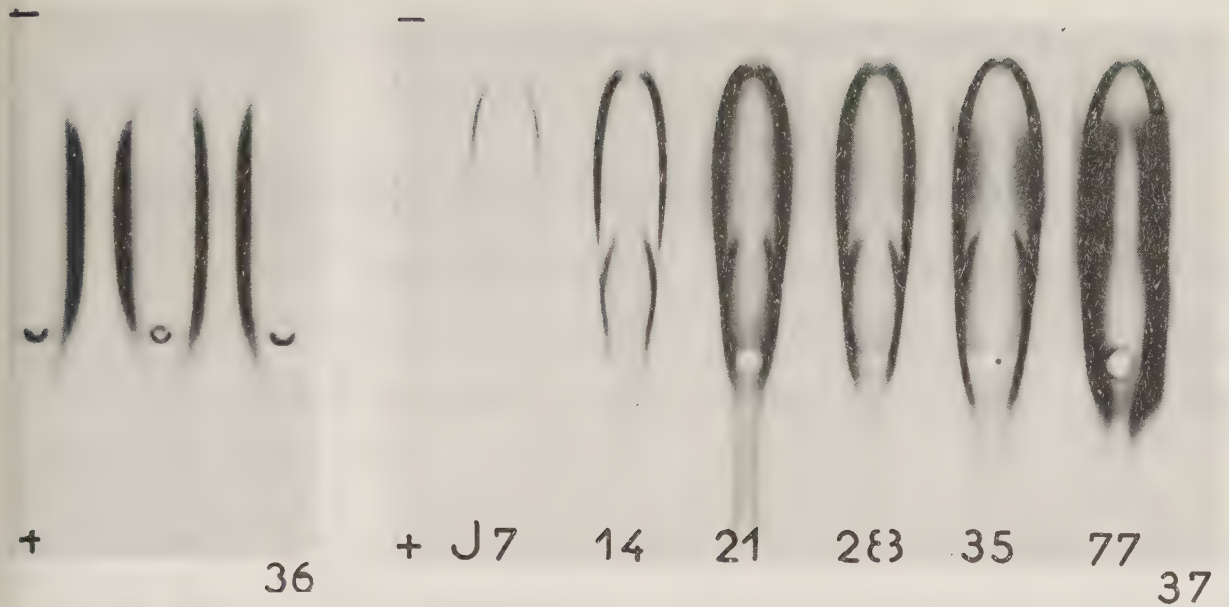


FIGURE N° 36 : Autoradio-AIE de deux immunsérums de lapin anti-muqueuse gastrique de singe vis-à-vis d'un extrait de muqueuse gastrique de singe couplé à de la vitamine B12-Co 58.

FIGURE N° 37 : Evolution, au cours de l'immunisation, des anticorps anti-facteur intrinsèque de porc (I.F.) du sérum du lapin n° 622. Migration des sérums. Dans les gouttières, dépôt de sérum antiglobulines de lapin mélangé à un volume égal de complexe I.F.B12-Co 58.

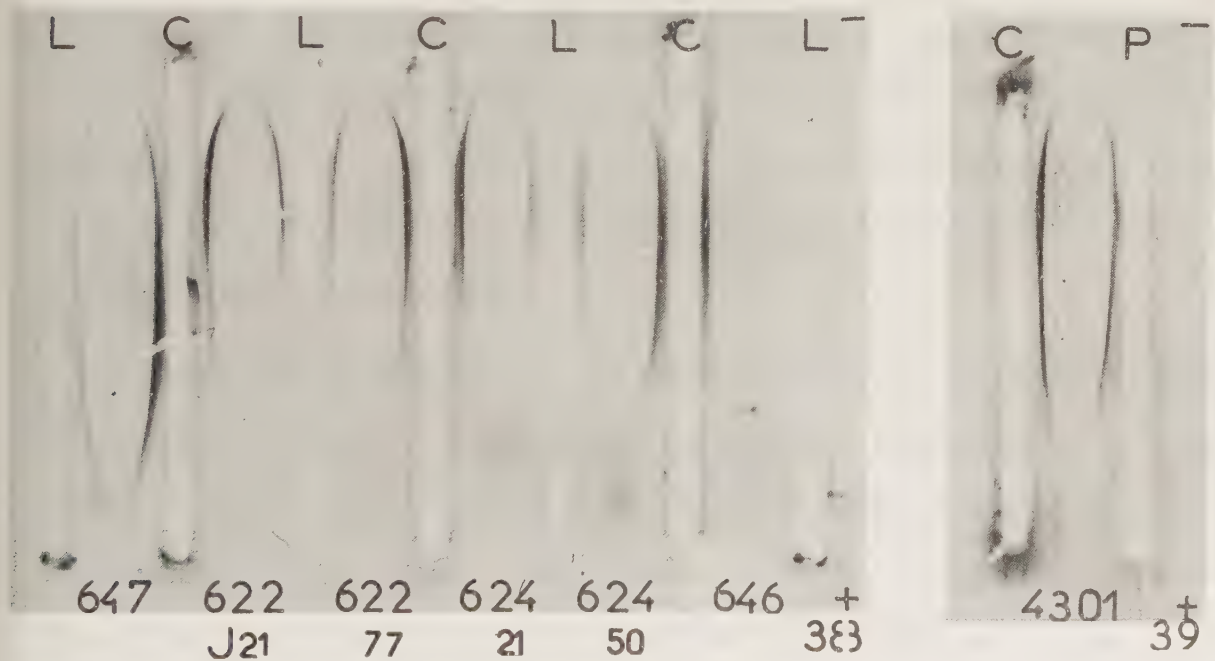


FIGURE N° 38 : Mise en évidence des anticorps anti-I.F. de singe (C) chez les lapins n°s 622, 624, 646 et 647, et anti-I.F. de lapin (L) dans le sérum du lapin n° 622 dès le 21° jour de l'immunisation.

FIGURE N° 39 : Mise en évidence d'anticorps anti-I.F. dans le sérum 4301 (provenant d'un Biermérien) vis-à-vis d'I.F. de singe (C) et d'I.F. de porc (P).

Nous l'avons dénommé l'antigène VI C sur le diagramme de la figure 8.

2°- Etude des immunosérums anti-facteur intrinsèque.

Deux types d'anticorps ont été recherchés : les anticorps de type bloquant qui inhibent la fixation de la vitamine B12 sur le facteur intrinsèque et les anticorps se fixant sur le complexe I.F.-B12 préformé.

a) Parmi les 4 lapins immunisés vis-à-vis des préparations purifiées de Facteur intrinsèque, seul l'un d'entre eux (622) a élaboré un anticorps bloquant susceptible d'inhiber par ml., la fixation de plus de 50 ng de B12 avec la quantité adéquate d'I.F. Cet anticorps est apparu à la suite de la seconde injection; son titre a décru à partir du 50ème jour de l'immunisation et les injections de rappel pratiquées en vue de le stimuler ont été sans effet.

Par contre, les 3 autres lapins ont élaboré un anticorps de faible titre, capable d'inhiber la fixation de 15 à 30 ng. de B12. Mais cet anticorps n'est apparu que plus tardivement, après 3 injections d'antigène.

b) Après immunodiffusion ou immunoélectrophorèse des sérums anti-I.F. vis-à-vis du complexe I.F.-B12, aucun arc de précipitation n'est visible en gélose, la réaction doit être révélée par autoradiographie. De plus, nous avons augmenté la sensibilité de la réaction par l'addition, au complexe I.F.-B12, de sérum de mouton anti-globulines de lapin.

Les 4 lapins ont élaboré des anticorps décelables par immunodiffusion et immunoélectrophorèse, à partir du 7ème jour de

l'immunisation. Quand l'immunodiffusion est pratiquée sans addition de sérum de mouton anti-globulines de lapin, l'anticorps précipitant n'est décelable qu'après 14 ou 21 jours, et à un titre toujours inférieur.

Avec l'emploi du sérum anti-globulines de lapin, le titre de l'anticorps précipitant a atteint :

	<u>1ère Inj. de Rappel</u>	<u>3ème Inj. de Rappel</u>
Sérum 622	16	I28
624	256	I28
646	I28	I000
647	I28	I000

Ainsi que le montre l'immunoélectrophorèse (fig. 37), les anticorps appartiennent aux deux classes d'immunoglobulines IgG et IgM; celles-ci apparaissent simultanément.

Sur les auto-radiogrammes, on voit apparaître à partir du 30ème jour suivant le début de l'immunisation, un 3ème arc fortement radioactif, situé en position interne par rapport à l'arc des IgG (fig. 37).

Nous avons recherché la nature de cet arc et avons observé son apparition dans des conditions expérimentales variées :

1°- Sur les plaques colorées à l'Amido-Schwartz, on observe également un arc de précipitation au même emplacement. Cependant, il est de très faible intensité par rapport à l'arc des IgG ou à celui des IgM.

2°- Ce 3ème arc radioactif apparaît également lorsque la réaction est menée en deux temps, c'est à dire lorsque la migration électro-

phorétique est suivie de l'introduction dans les gouttières de l'anticorps anti-globulines de lapin, avec ou sans facteur intrinsèque ; la vitamine B12 seule ou complexée à l'I.F. n'étant ajoutée qu'après la première série de lavages. Si la vitamine B12 seule est mélangée au sérum antiglobulinique, il n'y a aucune trace de radioactivité sur les arcs de précipitation.

3°- Cet arc n'est pas provoqué par le dépôt d'un excès de vitamine B12 non liée à l'I.F. En effet, la vitamine B12 libre a été séparée de la vitamine liée au facteur intrinsèque de deux manières : soit par dialyse pendant 24 heures sous agitation, soit par passage sur Sephadex G-25. Ces traitements n'ont pas modifié le tracé ou l'intensité du 3ème arc de précipitation.

4°- Nous avons pratiqué la révélation de l'arc de précipitation avec des quantités croissantes de complexe I.F.-B12, allant de 0,02 uCi à 0,225 μ Ci par gouttière. Dans ces conditions, les trois arcs radioactifs sont visibles.

5°- Par contre, l'examen de l'autoradiogramme, obtenu avec les Ig-globulines provenant du sérum du lapin 622, séparées par chromatographie sur DEAE-cellulose, ne permet pas d'observer l'arc de radioactivité interne.

Comme cet arc n'est pas visible sur les fractions éluées avec de plus fortes concentrations de sels, on peut estimer qu'il correspond à un constituant présent en faible quantité et perdu lors des manipulations.

3°- Communautés antigéniques du Facteur Intrinsèque de diverses espèces.

a) sérums expérimentaux.

Nous avons recherché la présence, dans les sérums anti-I.F. de porc, d'anticorps actifs sur des préparations de muqueuse gastrique provenant d'autres espèces afin d'établir les communautés antigéniques existant entre les différents facteurs intrinsèques.

Il existe dans le sérum des 4 lapins immunisés un anticorps précipitant vis-à-vis du broyat de muqueuse gastrique de singe. (fig. 38)

Chez 3 des 4 lapins, cet anticorps est décelable après la seconde injection d'antigène; il est décelable après la lère injection dans le sérum du lapin 624.

Par contre, seul l'un des lapins immunisés (622) vis-à-vis de la préparation Wes présente un anticorps actif vis-à-vis d'un broyat de muqueuse gastrique de lapin. Cet anticorps est révélabl à partir du 21ème jour de l'immunisation; il apparait en même temps que l'anticorps anti-estomac de cynocéphale.

Dans tous les cas, l'anticorps appartient à la classe des IgG .

	<u>anti-est. cyno.</u>	<u>anti-est. lapin</u>
622	J 21	J 21
624	J 14	O
646	J 28	O
647	J 28	O

Jour d'apparition des anticorps hétérophiles.

La recherche des anticorps bloquants a permis de mettre en évidence une faible inhibition, par le sérum du lapin 622, de la fixation de la vitamine B12 par le facteur intrinsèque de singe.

Le résultat négatif obtenu avec les 3 autres sérums était prévisible puisque seul le sérum 622 est capable d'inhiber la fixation d'une quantité importante de vitamine B12 sur le facteur intrinsèque de porc.

Le tableau 3 résume les résultats obtenus dans la recherche des communautés antigéniques entre le facteur intrinsèque de porc, de singe et de lapin, par l'étude des anticorps existant dans le sérum des lapins immunisés.

Les échantillons de sérum de lapins anti-I.F. de porc ont été absorbés avec du facteur intrinsèque de singe complexé à de la vitamine B12 non radioactive. Ce traitement a eu pour effet une diminution du titre de l'anticorps précipitant mesuré par radioimmunodiffusion.

	<u>Titre avant absorption</u>	<u>titre après absorption</u>
622	128	32
624	128	32

Dans le sérum de 5 des 6 lapins immunisés vis-à-vis de muqueuse gastrique de cynocéphale, il existe un anticorps actif vis-à-vis de la préparation de facteur intrinsèque de porc, décelable par radioimmunoélectrophorèse.

Nous avons également pratiqué une absorption croisée avec ces sérums et avons obtenu une diminution du titre de l'anticorps précipitant du même ordre que pour les sérums de

sérum	Anticorps bloquants		Ac. décelables par Radio-IE		
	IF porc	cyno	IF porc	cyno	lapin
622	50 ng	6 ng	+	+	+
624	25 ng	-	+	+	-
646	16 ng	-	+	+	-
647	30 ng	-	+	+	-
in anti-PgP	-	-	-	-	-

TABLEAU N° 3

m	Anticorps bloquants			Ac. décelables par Radio-IE	
	suc gastrique humain	muqueuse de cyno	IF porc	IF porc	muqueuse de cyno
		+	-	+	+
	++	++	-	+	+
	+++	+++	+	-	-
	+++	+++	+++	-	-
ums	-	-	-	-	-

TABLEAU N° 4

lapin anti-I.F. de porc.

	<u>Titre avant absorption</u>	<u>Titre après absorption</u>
76	128	32
733	64 .	16

b) sérums de malades atteints d'anémie de Biermer.

Nous avons recherché la présence d'anticorps de type bloquant par la méthode au charbon d'Ardeman et Chanarin et d'anticorps se fixant sur le complexe I.F. B12 par radio-immuno-électrophorèse avec un sérum de cheval anti-globulines humaines. Différents antigènes ont été utilisés :

- suc gastrique humain
- muqueuse gastrique de cynocéphale
- facteur intrinsèque de porc purifié

Les résultats de l'examen de 19 sérums sont résumés sur le tableau 4.

Les anticorps des sérums donnant une réaction positive avec le suc gastrique humain sont également mis en évidence avec la muqueuse gastrique de singe.

Par contre, la réaction est beaucoup moins importante, ou même négative avec l'I.F. de porc.

Ces résultats sont caractérisés par le faible pourcentage des cas positifs : 10% des sérums possèdent un anticorps actif sur le complexe I.F.- B12 et 20% possèdent un anticorps de type bloquant. Il faut remarquer que nous n'avons pas mis en évidence d'anticorps actif sur le complexe I.F.-B12 qui ne soit associé à un anticorps bloquant. Ceci confirme la quasi-totalité des résultats obtenus

par les autres auteurs (2, 14). L'anticorps décelable par radio-immunoélectrophorèse est dans les deux cas une IgG (fig. 39).

4°- Localisation du Facteur Intrinsèque.

Après avoir établi l'existence de communautés antigéniques entre le facteur intrinsèque de porc et de singe, nous avons entrepris de réaliser, par immunofluorescence, à l'aide des sérums de lapin anti-I.F. de porc, la localisation du facteur intrinsèque dans la muqueuse gastrique du singe Papio papio.

Les sérums ont été absorbés à l'aide de suspensions érythrocutaires des groupes sanguins A, B et O et d'extrait de muqueuse gastrique de porc lyophilisé. Ces extraits ont été faits à partir de fragments de la muqueuse de la région du cardia ; nous avons vérifié que cette région ne contenait pas de substance capable de se lier à la vitamine B12.

Les meilleures images ont été obtenues avec des coupes de muqueuse gastrique provenant d'animaux sacrifiés le jour même, et en utilisant des Ig-globulines séparées sur DEAE-cellulose. Après avoir essayé plusieurs types de fixateurs (alcool méthylique, acétone acide trichloroacétique, sulfate d'ammonium), nous avons choisi la simple dessiccation dans un courant d'air pendant 30 minutes.

La fluorescence est strictement localisée aux cellules bordantes de la muqueuse gastrique (fig. 40 et 41). Ces cellules sont surtout abondantes dans le tiers moyen des glandes fundiques. Certaines sont dispersées au milieu des cellules principales dans le fond des glandes, elles sont à peu près absentes du collet des glandes. L'absorption avec les extraits de cardia permet d'éliminer une légère fluorescence des cellules muqueuses.



FIGURES N°s 40 et 41 : Localisation du facteur intrinsèque dans la muqueuse gastrique fundique de Papio papio à l'aide des Ig-Globulines du lapin n° 624. Révélation avec un sérum fluorescent anti-globulines de lapin. (G x 170 et G x 660).

T R O I S I E M E P A R T I E

DISCUSSION GENERALE

Au terme de ce travail expérimental, nous voudrions tenter d'en dégager les principaux résultats et les ordonner autour de quelques idées principales.

Nous avons mis en évidence, dans la muqueuse gastrique du singe Papio papio, cinq précurseurs d'enzyme protéolytique. Nous avons étudié leurs caractères physicochimiques, les avons séparés sur DEAE-cellulose et en avons entrepris une étude immunologique afin de préciser les rapports pouvant exister entre eux. Nous voudrions - à la lumière des résultats obtenus par d'autres auteurs, pour les pepsinogènes, d'autres espèces ou pour d'autres enzymes - discuter le problème des relations entre les pepsinogènes afin de savoir si on peut les considérer comme des isoenzymes.

Nous avons établi les communautés antigéniques existant, d'une part, entre les pepsinogènes de différentes espèces, et d'autre part, entre les substances fixant la vitamine B12. Cette étude avait un double but : nous permettre la localisation par immunofluorescence des pepsinogènes et des substances se fixant à la vitamine B12, et nous procurer un substrat qui ne soit pas différent de l'antigène spécifique de l'espèce humaine pour la recherche des anticorps anti-facteur intrinsèque chez les sujets atteints d'anémie de Biermer. Nous aurons à justifier nos méthodes et nos résultats.

La présence des communautés antigéniques nous a amenés à rechercher l'existence d'une auto-immunisation chez les lapins immunisés à l'aide de préparations plus ou moins purifiées de muqueuse gastrique hétérologue. L'étude des mécanismes possibles d'apparition de cette auto-immunisation feront l'objet de la dernière partie de la discussion.

A. PLURALITE DES PEPSINOGENES - SONT-ILS DES ISOENZYMES ?

L'analyse électrophorétique d'un extrait de muqueuse gastrique du singe Papio papio nous a permis de mettre en évidence cinq précurseurs d'enzymes protéolytiques, actifs à pH 2.0

De nombreux enzymes associés aux lysosomes présentent un pH optimum d'activité acide, et nous avons voulu examiner leur participation éventuelle aux activités protéolytiques mises en évidence dans la muqueuse gastrique de Papio papio.

Ces enzymes ont été dénommés : cathepsines. Une revue récente leur a été consacrée (12). A l'heure actuelle, on connaît cinq cathepsines : A, B, C, D et E. Avec la sérum-albumine comme substrat, seules sont actives la cathepsine D et la cathepsine E ; la cathepsine D de lapin a un pH d'activité optimum de 3.5, la cathepsine E a un pH optimum de 2.5 (91).

L'étude de l'activité protéolytique de chacune des protéases, séparées sur DEAE-cellulose, selon la technique de Lapresle et Webb nous a permis d'observer une faible activité à pH 3.5, mais nous n'avons pas mis en évidence d'enzyme ayant une activité maximale à ce pH. Pour la cathepsine E, le problème est plus complexe du fait que son optimum d'activité est très voisin de celui des pepsines.

Etant associées aux lysozomes, les cathepsines exercent leur action protéolytique dans le cytoplasme cellulaire; elles ne sont pas excrétées, et par conséquent le suc gastrique n'en contient pas. Comme les études électrophorétiques et immuno-électrophorétiques du suc gastrique et de l'extrait de muqueuse activé donnent des résultats identiques, on peut en conclure que cet extrait ne contient pas de cathepsines D et E.

Les zymogènes de la muqueuse gastrique du singe Papio papio ont les propriétés des pepsinogènes de mammifères : stabilité à pH alcalin, manque d'activité dans la coagulation du lait à pH 5.3 et transformation à pH 2.0 en enzymes protéolytiques. Ces derniers ont les propriétés des pepsines : activité optimale vis-à-vis de substrat protéique de pH 2.0 à pH 2.5, activité dans la coagulation du lait à pH 5.3 et dénaturation en milieu alcalin.

L'hétérogénéité de protéases observée en électrophorèse peut avoir plusieurs causes :

- Il faut d'abord envisager la possibilité d'une dénaturation pendant la préparation des extraits; cette dénaturation peut être provoquée par un début d'autolyse pepsique ou par une dégradation alcaline.

Perlman (108) a montré que la pepsine est susceptible - par un simple processus d'autodigestion - de donner naissance à des fragments dialysables et actifs vis-à-vis de différents substrats. L'incubation à 37° C et à pH 5.6 doit être maintenue 24 heures pour retrouver dans le dialysat l'équivalent de 10 à 20% des protéines initiales.

Au cours de nos travaux, les estomacs ont été prélevés

dans les minutes suivant le sacrifice de l'animal et immédiatement rincés et immergés dans un tampon faiblement alcalin, ce qui laisse peu de temps à la pepsine pour agir.

Une éventuelle dégradation acide aurait entraîné une activation des pepsinogènes. L'électrophorégramme obtenu avant et après traitement alcalin à pH 9.0 eût alors été différent, ce qui n'a pas été le cas. De plus, nous avons vérifié, par la non coagulation du lait et la négativité de la réaction vis-à-vis du "hide powder" (118) l'absence d'activité protéolytique des extraits de muqueuse gastrique.

L'hypothèse d'une dénaturation alcaline ne peut pas, a priori, être écartée complètement. Il faut cependant remarquer que les résultats obtenus après extraction en tampon phosphate à pH 8.0 sont rigoureusement identiques à ceux obtenus en tampon bicarbonate à pH 7.5 .

De plus, la durée d'immersion dans le tampon alcalin des fragments destinés à l'obtention de coupes effectuées au cryostat ne dépasse pas 15 à 30 minutes et l'électrophorégramme de ces coupes est superposable à celui des extraits de muqueuse gastrique.

Il n'est pas possible de réduire de façon définitive l'hypothèse d'une dénaturation - acide ou alcaline - pendant la procédure d'extraction. Mais l'emploi de la technique d'électrophorèse des coupes de muqueuse gastrique nous a permis d'observer les mêmes résultats qu'avec les extraits. Etant donné les conditions de réalisation de cette épreuve, nous estimons qu'une dénaturation n'a pas pu se produire; d'autant plus que celle-ci serait identique à celle qui aurait eu lieu pendant l'extraction.

- D'autres causes d'erreur dans l'interprétation de ces résultats doivent être recherchées. Au cours de l'électrophorèse, il peut arriver qu'une protéine se combine avec d'autres protéines et se polymérise, ou bien que l'un des sels du tampon exerce une interaction avec l'une ou l'autre des formes étudiées : la conséquence en est, dans les deux cas, l'apparition de nouvelles bandes (24). Nous avons éliminé ces facteurs, d'abord en soumettant à une deuxième électrophorèse les protéases déjà séparées par une première migration, ce qui nous a permis de retrouver les bandes d'activité protéolytique au même emplacement - et ensuite en changeant la nature des sels (citrate ou Véronal), le pH des tampons (5.6, 8.2, 8.6) ou la force ionique (Véronal 0,02 M à 0,06 M); ces différentes modifications n'ont pas altéré le nombre de bandes.

En fait, la pluralité des enzymes protéolytiques du suc gastrique humain est reconnue depuis 1940.

Freudenberg et coll. (44) ont démontré l'existence de 2 pH optimum d'activité pour le suc gastrique vis-à-vis d'un substrat protéique soluble. Ce résultat a été confirmé lors des premières séparations du suc gastrique sur amberlite effectuées par Richmond et coll. (117). Le premier enzyme élué correspond à la "pepsine" et il est actif aux environs de pH 2.0, le second enzyme actif à pH 3.2 correspond à la "gastricsine".

Les travaux, en 1959, de Ryle et Porter (123) ont confirmé l'existence de 3 enzymes chez le porc. Ces auteurs ont séparé, par relargage salin et chromatographie sur DEAE-cellulose d'une préparation de pepsine de porc brute, 3 pics possédant une

activité protéolytique. Ce sont les pepsines A, B, C.

Par contre, l'existence de la pluralité des pepsinogènes est plus controversée.

Après relargage au sulfate d'ammonium d'un extrait de muqueuse gastrique humaine et chromatographie sur DEAE-cellulose en tampon phosphate à pH 7.5, Tang et Tang (147) obtiennent 2 pics élués respectivement avec 0,07 M et 0,09 M de phosphate. Le pic principal I A homogène à l'ultracentrifugation et sur gel d'amidon, donne naissance - après activation - à deux enzymes, dont l'un la pepsine est active à pH 1.8 et l'autre la gastricsine exerce son activité maximale à pH 3.0. Ces auteurs observent que le rapport pepsine/gastricsine varie selon le pH auquel est effectuée l'activation. In vivo, les quantités respectives des deux enzymes pourraient varier en fonction de l'acidité gastrique.

D'autres groupes d'auteurs ont observé la pluralité des pepsinogènes d'homme et de porc.

C'est par chromatographie sur DEAE-cellulose à pH 5.3 d'un extrait de muqueuse gastrique humaine, que Seijffers et coll. (139-140) ont séparé 3 zymogènes. Le 1er zymogène élué serait d'origine pylorique et juxta-pylorique, les deux derniers sont d'origine fundique. L'hétérogénéité observée à la chromatographie serait une conséquence de la différence dans le lieu de sécrétion des pepsinogènes.

Kushner et coll. (87) Hirsch-Marie et coll. (69-71) ont mis en évidence par électrophorèse en gélose et séparé par chromatographie sur DEAE-cellulose, 4 pepsinogènes de la muqueuse gastrique humaine. Mais ils n'ont pas observé de différence dans

l'activité des différentes pepsines obtenues, par activation des zymogènes ou, à partir du suc gastrique.

Ryle a montré que, à chacune des 3 pepsines de porc isolées antérieurement (122), correspondait un pepsinogène dans la muqueuse gastrique. Dans un travail récent, Lee et Ryle (92) ont isolé un 4ème pepsinogène représentant environ 5% de l'activité protéolytique de la muqueuse.

Dans une étude récente, Turner et coll. (153) ont repris l'ensemble des travaux consacrés aux protéases humaines. Ils ont isolé le zymogène I A à l'aide d'un gradient de phosphate, selon la technique de Tang et Tang. Lorsque cette préparation I A est soumise à une 2° chromatographie avec un gradient de ClNa, ils obtiennent 3 pepsinogènes. De plus, la préparation I A est hétérogène en électrophorèse sur gélose, et les résultats concordent avec ceux obtenus avec la chromatographie en ClNa. Ces auteurs concluent qu' "on ne peut pas soutenir plus longtemps l'homogénéité du zymogène I A et son rôle de précurseur de plusieurs enzymes".

Les divers groupes d'auteurs s'accordent maintenant pour penser qu'il existe dans le suc gastrique plusieurs pepsines et dans la muqueuse gastrique plusieurs pepsinogènes; mais les différentes classifications proposées reposent encore sur des critères différents.

Le premier caractère qui différencie le pepsine de la gastricsine est, pour Tang et Tang (147), le pH auquel ces enzymes sont actifs. Ryle et Porter (123) ont caractérisé les 3 pepsines de porc par leur aptitude à hydrolyser l'hémoglobine (paraepsine II

ou pepsine C), le N-acétyl-L-phényl-alanyl-L-diiodotyrosine (parapepsine I ou pepsine B) ou les deux substrats (pepsine A).

Ces trois constituants sont inégalement sensibles à l'action des alcalis.

La quatrième pepsine correspondant au pepsinogène D isolé par Lee et Ryle (92) est active aussi sur les deux substrats. Seijffers et coll. (139) ont pensé rattacher les différences observées dans les pepsines aux lieux de sécrétion des pepsinogènes.

Plus récemment, Hanley et coll. (61), Etherington et Taylor (37) ont proposé des nomenclatures des pepsinogènes reposant sur la mobilité électrophorétique. Mais ils n'ont pas complété leur caractérisation par une étude à l'aide d'anticorps homologues.

Kushner et coll. (87) ont établi une classification des pepsinogènes humains selon la mobilité électrophorétique et les caractères immunochimiques.

A l'étude de l'extrait de muqueuse gastrique de Papio papio et des fractions isolées par chromatographie, nous avons observé un seul pH optimal d'activité voisin de pH 2.0 vis-à-vis de la S.A.B. et de l'hémoglobine.

Hirsch-Marie n'a pas trouvé de différence dans l'activité des pepsines humaines isolées pour les divers substrats protéiques et synthétiques étudiés (67).

Les conditions expérimentales différentes, dans lesquelles nous avons travaillé pourraient expliquer ces résultats différents. En effet, la forme de la courbe d'activité d'un enzyme peut être modifiée en faisant varier certains paramètres de la réaction : concentration de substrat, des ions.... Ainsi Schlamowitz et coll. (131), étudiant les effets de la concentration ionique sur

l'hydrolyse pepsique de la S.A.B., ont obtenu une courbe d'activité en fonction du pH avec un ou deux maximums en passant de 0,15 M à 0,50 M de NaCl. Seijffers et coll. (137), analysant les effets de la variation de concentration de la S.A.B. et des ions dans la protéolyse pepsique, ont observé une diminution de celle-ci en augmentant la concentration du substrat.

Nous avons classé les pepsinogènes et pepsines selon leurs caractères physicochimiques et immunologiques, suivant la nomenclature et les méthodes proposées par Kushner et coll. (87).

L'étude des mobilités électrophorétiques et du comportement chromatographique donne des résultats comparables. Chacun des pepsinogènes mis en évidence par électrophorèse a pu être séparé par chromatographie, à l'exception de P I et P II. L'emploi des immunosérums spécifiques permet de confirmer ces résultats. Après analyse immunoelectrophorétique, on peut observer 3 arcs de précipitation possédant tous une activité protéolytique vis-à-vis de la S.A.B. et dont le plus anodique présente une double courbure. Les arcs correspondant à P IV, P III et P II ne sont pas reliés entre eux, ce qui prouve que les pepsinogènes correspondants n'ont pas de caractères antigéniques communs. Il serait donc difficile d'admettre qu'ils proviennent d'une molécule unique qui serait dégradée.

Les deux constituants les plus basiques P IVb et P IVa sont élués en premier, lors de la chromatographie sur DEAE-cellulose à pH 5.4 . Au point de vue immunologique, ils sont identiques, ainsi que le montre la réaction de précipitation en gélose.

Le zymogène P III présente la particularité de donner naissance à deux enzymes actifs, particularité confirmée par la réaction d'immunodiffusion. L'hypothèse selon laquelle le composant

le plus basique serait constitué par une fraction du zymogène non activé est réfutée par deux faits : les mobilités électrophorétiques des deux nouveaux enzymes sont supérieures à celles du zymogène et ils sont l'un et l'autre inactivés par le traitement alcalin.

Les résultats de l'analyse immunochimique tendent à démontrer l'identité antigénique de P II et P I. L'étude en immuno-diffusion de l'immunsérum anti-muqueuse gastrique vis-à-vis des deux zymogènes montre la coalescence parfaite des deux lignes de précipitation. De plus, par immuno-électrophorèse, les deux constituants ne présentent qu'une seule ligne de précipitation à double courbure (fig.17). P I pourrait être un produit de dégradation de P II. Nous n'avons pas observé de transformation in-vitro de P II en P I par activation. De plus, la dégradation, si elle intervenait, s'effectuerait in vivo puisque sur les coupes de muqueuse gastrique soumises à l'électrophorèse on peut observer les deux pepsinogènes P II et P I.

Peut-on considérer les pepsinogènes du singe Papio papio comme un groupe d'isoenzymes (ou isozymes) ? Ce terme d'isozyme a été proposé par Markert et Moller en 1959 (97) pour définir des protéines différentes ayant la même action catalytique.

Ces enzymes peuvent provenir soit d'un même organe et coexister éventuellement dans la même cellule comme les malate - déshydrogénases (151), soit d'organes différents comme les lactico-déshydrogénases (169). Ces dernières ont toutes les 5 un poids moléculaire de 135.000, par contre l'alcool déshydrogénase de la levure a un poids moléculaire de 150.000 et elle est considérée comme une forme isozymique de l'alcool-déshydrogénase du foie, qui a un poids

moléculaire de 84.000 (32).

- Les isoenzymes peuvent être différenciés par leur degré de thermorésistance : LD1 est plus résistante que LD4 ou LD5
- par leur sensibilité aux variations de pH : l'isoenzyme II de l'aspartate-amino-transférase du coeur de chien est insensible à un séjour à pH 6.0, alors que l'activité de l'isoenzyme I est réduite de 40% (47).
 - par leur sensibilité aux inhibiteurs : l'une des malate-déshydrogénases du coeur de boeuf est inhibée par le p-chloromercurobenzoate, l'autre ne l'est pas, (141)
 - par leur prédilection pour un substrat : la forme alpha de l'allostérase du plasma de cobaye est active vis-à-vis des triglycérides et de la diacétyl-morphine, alors que la forme bêta n'est pas capable d'attaquer ces substrats (9).

La composition en acides aminés varie selon les formes de l'isoenzyme, ce qui se traduit par des différences dans la mobilité électrophorétique et le comportement chromatographique. Pour certains de ces isoenzymes, des anticorps homologues ont été obtenus : par exemple, l'anticorps anti-LD1 est inhibiteur de l'activité de cette déshydrogénase mais n'a pas d'effet sur LD5 (96).

La répartition des pepsinogènes dans l'organisme a été étudiée chez l'homme, principalement. Hirsch-Marie a identifié le pepsinogène P II dans le plasma sanguin et dans l'urine où il est excrété en quantité importante (70). La présence de pepsinogène dans le plasma séminal a été observée par Lundquist et Seedorf (95). L'identité de ce pepsinogène et du pepsinogène P III gastrique a été établie par Hirsch-Marie à l'aide d'anticorps homologues. (67).

Il est admis que les pepsinogènes présents dans certains liquides de l'organisme (plasma sanguin et urine) proviennent de la sécrétion gastrique.

Nous avons mis en évidence les ressemblances existant entre les cinq pepsinogènes de singe : maximum d'activité aux environs de pH 2.0 vis-à-vis de substrat protéique, égale résistance au traitement alcalin. Nous avons prouvé que l'hétérogénéité observée n'était pas provoquée par une dénaturation consécutive aux procédés d'extraction, et avons différencié les pepsinogènes par leur mobilité électrophorétique et l'élution en chromatographie, ainsi que par leur comportement antigénique. Les résultats obtenus, après immuno-électrophorèse notamment, nous amènent à considérer qu'il existe au moins trois classes de pepsinogènes : la première comprend P I et P II, la seconde est représentée par P III (le fait que P III se divise, après activation, en deux enzymes suggère qu'il est peut être constitué, lui aussi, de deux sous-unités); la dernière catégorie comprend P IVa et P IVb. Nous avons inclus P I et P II dans la même catégorie, car nous n'avons pas apporté la démonstration irréfutable qu'ils n'étaient pas issus de la même molécule.

Nous proposons de considérer ces trois catégories de protéases comme un groupe de trois isoenzymes. En effet, il s'agit de protéines enzymatiques provenant d'un seul organe et d'un seul tissu et ayant la même action catalytique; de plus elles peuvent être séparées par le moyen de l'électrophorèse, de la chromatographie et par des techniques immunochimiques.

B - COMMUNAUTES ANTIGENIQUES.

La présence de déterminants antigéniques communs entre les pepsinogènes de différentes espèces a été observée antérieurement : homme et porc ; Kushner et coll.(87), porc et lapin ; Samloff et coll.(130), homme, porc et cheval ; Van Vunakis et coll.(163). Certaines applications pratiques ont été faites de ces résultats. Par exemple, Hirsch-Marie a proposé un dosage du pepsinogène urinaire (P II) selon la méthode de Laurell à l'aide d'immunsérum de lapin anti-pepsinogène de porc purifié (68).

Ainsi que le montre l'immunoélectrophorèse (fig. 21 et 27) le sérum des lapins immunisés vis-à-vis du PgP contient un anticorps actif vis-à-vis des pepsinogènes de singe et de lapin.

La préparation commerciale de PgP utilisée contient deux pepsinogènes qui correspondent - par leur mobilité électrophorétique - à 2 des pepsinogènes (P II et P III) de singe.

Les sérums anti-PgP ne sont pas actifs sur les pepsinogènes P IVa et P IVb, et l'absorption des sérums anti-muqueuse gastrique de singe à l'aide de PgP laisse subsister l'anticorps anti-P IV. Par contre, cette absorption provoque la disparition totale ou partielle des anticorps anti-P III et anti-P II, et aussi de l'anticorps anti-P I .

On pourrait envisager l'intervention d'une absorption non spécifique, puisqu'il y a disparition totale des arcs de précipitation dans l'un des cas, alors que l'immunodiffusion ne révèle qu'une communauté antigénique entre le PgP et les pepsinogènes de singe. (fig. 29). Cependant, la présence en immuno-électrophorèse d'un arc de précipitation entre le sérum anti-PgP et les extraits de muqueuse gastrique de singe et de lapin, apporte la preuve qu'il s'agit bien

d'une réaction spécifique, d'autant plus que la réaction peut être mise en évidence par la révélation de son activité protéolytique.

L'établissement de relations entre les facteurs intrinsèques d'homme et de porc a été indirectement démontré dès 1929 par le succès du traitement de l'anémie pernicieuse par des ingestions d'extraits de muqueuse pylorique de porc (140, 145, 170). Il a été ainsi prouvé que le facteur intrinsèque de porc se fixait à la vitamine B12 et était capable chez l'homme d'en promouvoir l'absorption.

Cependant, les premiers cas de malades résistant au traitement par le facteur intrinsèque hétérologue ont été rapportés, en 1954 par Mollin et Ross (102). C'est à Schwartz et coll. (136) que nous devons d'avoir compris que cette résistance était provoquée par un blocage de l'absorption. Ils ont réussi à lever cette résistance par l'addition de suc gastrique humain. Dans un travail ultérieur, Schwartz (134) a mis en évidence des anticorps anti-I.F. chez ces malades résistants.

La première démonstration de l'existence de réactions croisées entre le facteur intrinsèque d'espèces différentes a été apportée par Taylor en 1959 (148) et confirmée par Schwartz en 1960 (135). Ils ont observé que le sérum de malades réfractaires à un traitement par le facteur intrinsèque de porc et incubé in vitro avec du facteur intrinsèque d'homme ou de rat diminue la capacité d'absorption de la vitamine B12, in vivo.

La recherche systématique des communautés antigéniques entre les facteurs intrinsèques d'homme et de porc a été alors

effectuées à l'aide de sérums provenant de sujets atteints d'anémie de Biermer, traités par des préparations hétérologues et de sérums expérimentaux provenant principalement de lapin ou de chèvre. Les résultats diffèrent selon les techniques employées, et l'origine de l'anticorps. De plus, il faut envisager séparément les résultats concernant les deux groupes principaux de déterminants antigéniques de la molécule de facteur intrinsèque.

Le premier groupe est localisé au site de liaison avec la vitamine B12, le second est indépendant de ce site. Chaque déterminant est capable de provoquer l'élaboration d'anticorps distincts. Au premier site correspondent les anticorps bloquants, c'est-à-dire ceux qui se manifestent par leur aptitude à bloquer la combinaison du facteur intrinsèque à la vitamine B12. Ces anticorps appartiennent toujours à la classe des IgG (49). Les anticorps actifs sur le complexe I.F.-B12 sont dirigés contre le deuxième site. Ils peuvent appartenir aux deux classes d'immunoglobulines IgG et IgM. Ces derniers anticorps peuvent se fixer sur le facteur intrinsèque, sans que celui-ci soit associé à la vitamine B12 ; le complexe antigène-anticorps, ainsi formé, est capable de fixer la vitamine B12 secondairement, comme cela a été démontré par Garrido-Pinson (46) et par nous-mêmes par l'immunoélectrophorèse effectuée en deux temps.

En ce qui concerne les sites de liaison avec la vitamine B12, des résultats contradictoires ont été relatés. Par une technique de dialyse modifiée, Ramsey et Herbert (112) ont observé la spécificité d'espèce de ces sites à l'aide de sérums de Biermériens traités et non traités, et de sérums de lapin anti-I.F.

d'homme et de porc. L'absence de réactions croisées tient peut-être au manque de sensibilité de la méthode utilisée, qui se développe en excès d'antigène (121).

Les ressemblances existant entre le facteur intrinsèque de diverses espèces ont été soupçonnées par Abels (1) puis établies par Irvine (79). Cet auteur a démontré que les sérums de Biermériens inhibaient l'absorption de la vitamine B12 par l'I.F. d'homme et de porc. A l'étude de sérums de lapin et de chèvre anti-I.F. humain et de porc, Goldberg et coll. (49) ont observé des communautés entre les sites de liaison à la vitamine B12 de ces deux catégories d'antigène.

Parmi les quatre lapins que nous avons immunisés vis-à-vis du Facteur intrinsèque de porc, l'un d'eux (n° 622) présente dans son sérum un anticorps de type bloquant, capable d'inhiber la fixation de plus de 50 ng. de vitamine B12 par ml. Cet anticorps inhibe également la fixation d'environ 6 ng de vitamine B12 (soit 12% de la quantité mise en jeu), avec le facteur intrinsèque de cynocéphale. Le sérum des trois autres animaux possède des anticorps de type bloquant de faible titre, et ils n'ont pas d'anticorps actifs sur le facteur intrinsèque de singe.

A l'examen des sérums de Biermériens, nous avons observé une concordance parfaite entre les résultats obtenus avec les I.F. humain et de cynocéphale. Ce sont les deux sérums qui possèdent l'activité inhibitrice la plus importante vis-à-vis de ces antigènes qui sont aussi susceptibles d'inhiber la fixation par le facteur intrinsèque de porc (tableau 4).

L'observation de réactions croisées nous incite à

affirmer la présence de déterminants antigéniques communs, au site de liaison avec la vitamine B12, entre les facteurs intrinsèques d'homme, de Papio papio et de porc. Mais le fait que l'activité des sérums examinés soit plus importante vis-à-vis de l'antigène homologue est une preuve de l'existence de différences dans la conformation de ces antigènes. Il y aurait donc plusieurs déterminants antigéniques, dont certains seraient spécifiques d'espèce et d'autres seraient communs aux 3 espèces considérées.

Les relations existant entre le second groupe de sites antigéniques de la molécule du facteur intrinsèque d'homme et de porc ont été étudiées par Gullberg et coll. (58), qui n'ont pas observé de réaction de précipitation en gélose du complexe I.F.-B12 de porc par le sérum de Biermériers. Par contre, l'examen de sérums expérimentaux par la technique de rétention électrophorétique avait permis aux mêmes auteurs de conclure à l'existence de communautés antigéniques entre l'I.F. d'homme et de porc. (57). C'est en augmentant la sensibilité de la méthode par addition au complexe antigénique I.F.-B12 de sérum antiglobulines humaines précipitant le sérum de Biermériers, que Goldberg et coll. ont pu mettre en évidence de telles communautés entre l'I.F. d'homme et de porc (49).

Les résultats de l'examen - par radioimmunoélectrophorèse selon la même technique que Goldberg et coll. - de 19 sérums de malades atteints d'anémie pernicieuse, en nous permettant d'observer la présence de tels anticorps chez 2 d'entre eux, confirme l'existence de relations antigéniques entre l'I.F. de singe et l'I.F. de porc.

De plus, nous avons - par immunoélectrophorèse et immuno-

diffusion - mis en évidence dans le sérum des quatre lapins immunisés vis-à-vis des préparations de facteur intrinsèque de porc, un anticorps actif sur le broyat de muqueuse gastrique de cynocéphale. L'un de ces sérums (622) possède aussi un anticorps actif vis-à-vis du broyat de muqueuse gastrique de lapin.

Ces anticorps ne sont décelés qu'à l'aide de l'immun-sérum anti-globulines de lapin. On peut supposer que le précipité formé par le complexe anticorps anti-I.F. de porc et I.F. de singe est d'une faible stabilité et qu'il est dissocié lors des lavages, ou bien qu'il se dissout rapidement en présence d'un excès d'antigène (128). C'est probablement pour l'une de ces raisons que nous n'avons pu obtenir de réactions d'immunodiffusion révélatrices de communautés antigéniques.

Cependant, les résultats des épreuves d'absorption croisée apportent une preuve complémentaire de leur existence. En effet, après absorption des immun-sérums anti-facteur intrinsèque de porc, avec de la muqueuse gastrique de cynocéphale complexée à de la vitamine B12 non radioactive, ou bien des sérums anti-estomac de cynocéphale, avec du facteur intrinsèque de porc, on observe une diminution du titre de l'anticorps précipitant vis-à-vis de son antigène. Il est donc possible, pour ce deuxième groupe de déterminants d'établir les mêmes conclusions que pour les sites liés à la fixation de la vitamine B12. Certains de ces déterminants antigéniques sont spécifiques d'espèce et d'autres sont communs aux facteurs intrinsèques de porc et de singe.

A la suite de ces différents travaux, on pouvait envisager de pratiquer la mise en évidence, dans le sérum de malades

atteints d'anémie de Biermer, d'anticorps anti-facteur intrinsèque, du type bloquant ou bien actif sur le complexe I.F.-B12, à l'aide de préparations purifiées de porc; mais l'obtention de résultats positifs aurait pu être attribuée à la présence d'un anticorps anti-I.F. de porc consécutif au traitement, et non à la présence d'un auto-anticorps. C'est pour cette raison que nous avons décidé d'utiliser des extraits de muqueuse gastrique de singe.

Les extraits de muqueuse gastrique présentent de plus, sur le suc gastrique, l'avantage de ne contenir que des formes non activées des protéases. Par conséquent, il n'y a pas non plus, dans les extraits alcalins, de produits de dégradation du facteur intrinsèque par la pepsine (ou constituant " I " de Glass et coll., 132). Les constituants qui fixent la vitamine B12 dans la muqueuse gastrique ont donc, dans leur quasi-totalité, les caractères du facteur intrinsèque.

Les immun-sérums anti-pepsinogène et anti-I.F. de porc, contenant des anticorps actifs sur les pepsinogènes et l'I.F. de singe, ont été utilisés pour étudier la répartition de ces antigènes dans la muqueuse gastrique fundique du singe.

Nous avons localisé, par immunofluorescence des granulations de pepsinogène dans le cytoplasme des cellules principales. Leur localisation correspond à celle des granulations colorées par le Bleu de Toluidine et chargées de Tryptophane. Nous n'avons pas observé de pepsinogène dans d'autres cellules des glandes fundiques, ce qui est en accord avec les résultats de l'histologie. La présence ou l'absence de pepsinogène dans les cellules muqueuses du col est un sujet de controverse pour les histologistes (78), en

raison des relations pouvant exister entre les diverses catégories de cellules des glandes fundiques. Par la méthode d'immunofluorescence directe, à l'aide de sérum anti-PgP, Yasuda et coll. (173) ont observé la présence de pepsine dans les cellules muqueuses du col de l'estomac de porc; mais ils ne donnent pas de précision sur la façon dont ils ont vérifié la spécificité de leurs immunosérums.

L'absence, dans l'immun-sérum anti-PgP, d'anticorps actifs sur les protéines sériques du porc et du singe a été vérifiée en immunoélectrophorèse. L'absorption des sérums, à l'aide de globules rouges humains et de singe, a été pratiquée afin d'inhiber les agglutinines spécifiques des antigènes A ou B de groupes sanguins, mais de faible titre, que les animaux ont élaboré pendant l'immunisation. En effet, l'estomac de porc est l'une des principales sources de substance A et l'antigène érythrocytaire A^P du porc est très proche de l'antigène humain (33). Les substances de groupe sanguin de type alcool-soluble ont été localisées chez l'homme dans les cellules bordantes, alors que les substances hydrosolubles sont situées dans les cellules de l'épithélium de revêtement et les cellules muqueuses du col (48). Aucune modification de la fluorescence des cellules principales n'a été observée, après l'absorption de l'immun-sérum à l'aide de globules rouges.

La spécificité d'organe des sérums a été vérifiée par immunofluorescence, vis-à-vis d'autres organes du tube digestif ou d'organes possédant des enzymes éventuellement susceptibles de donner des réactions croisées avec le pepsinogène (enzymes pancréatiques, cathepsines spléniques).

La localisation du facteur intrinsèque a été effectuée,

par immunofluorescence, à l'aide des sérums de lapin anti-I.F. de porc et des globulines IgG purifiées à partir de ces sérums. Les sérums et les globulines ont été absorbés avec des suspensions érythrocytaires d'homme et de singe, afin d'inhiber les anticorps correspondants. La légère fluorescence des cellules muqueuses a disparu après absorption des sérums avec un broyat de muqueuse provenant de la zone du cardia. Nous avons observé une fluorescence du cytoplasme des cellules bordantes des glandes fundiques, mais n'avons pas retrouvé l'aspect membranaire signalé par Fisher et Taylor (40). Des examens hématologiques ont été pratiqués chez les lapins pendant la durée de l'immunisation et ils n'ont révélé aucun signe d'anémie mégaloblastique. L'examen en immunofluorescence de la muqueuse gastrique des lapins, pratiqué le jour du sacrifice, n'a pas permis de mettre en évidence de signes d'autoimmunisation que l'on puisse rattacher à une gastrite atrophique. Dans ces conditions, nous ne pensons pas que la fluorescence observée après action de ces immun-sérums expérimentaux soit à mettre sur le compte de la présence d'un anticorps anti-cellules bordantes.

Ces résultats sont à rapprocher des observations de Hoedemaker et coll. (72) qui ont étudié la répartition du facteur intrinsèque sur les coupes de muqueuse gastrique par autoradiographie à l'aide de cyanocobalamine ayant une activité spécifique très importante (60 à 120 μ c /ug).

Ils ont ainsi localisé l'I.F. dans les cellules bordantes de la muqueuse gastrique d'homme, de Macacus rhesus, Chat, Lapin, Cobaye et Boeuf, dans les cellules principales du rat et de la

- 111

souris, dans les cellules glandulaires de la zone pylorique et dans les glandes de Brunner du porc (73).

La fixation de la vitamine B12 est inhibée par le sérum de Biermériers présentant des anticorps anti-I.F.

C - LES AUTO-ANTICORPS ANTI-ESTOMAC.

Nous n'avons pas, au cours de ce travail, recherché systématiquement la production d'un syndrome gastrique imputable à l'intervention d'une auto-immunisation. Ce problème avait fait l'objet d'une étude antérieure (126).

Cette expérience nous a permis de mettre en évidence des auto-anticorps anti-muqueuse gastrique dans le sérum des lapins immunisés vis-à-vis de différents types d'antigène, d'origine hétérospécifique : extraits de muqueuse gastrique de cynocéphale et de rat (126), pepsinogène de porc (125), facteur intrinsèque de porc ainsi que de bactéries (127).

Rappelons que les injections d'antigène ont été accompagnées d'adjuvant de Freund complet ou d'une suspension de Corynebacterium parvum pour les 3 premières catégories d'animaux, et ont été dépourvues d'adjuvant pour les lapins immunisés contre les suspensions bactériennes.

Les anticorps ont été mis en évidence par immunofluorescence, fixation du complément ou précipitation en gélose.

Nous n'avons pas décelé d'auto-anticorps anti-muqueuse gastrique chez les lapins immunisés avec des extraits de muqueuse gastrique de lapin.

Cette observation s'accorde avec les conclusions d'autres auteurs : la formation d'auto-anticorps semble plus intense à la

suite d'injection d'antigène hétérospécifique qu'après l'injection d'antigène isologue ou autologue. La formation d'auto-anticorps a été signalée dès 1914 pour le cristallin par Morax et Bollack (103) puis par Halbert et coll. (59), pour l'uvée et la cornée par Wacker et Dodd (165), le cerveau par Lewis (93) le coeur par Kaplan (83), les surrénales par Barnett et coll. (11), les nucléoprotéines par Goodman (50), le foie par Asherson et Dumonde (7), le tractus digestif par Broberger et Perlmann (18), Holborow et coll. (75).

Dans le cas de la thyroïde, Witebsky et Rose ont, dès 1956, obtenu la production d'auto-anticorps chez le lapin immunisé avec des extraits totaux de thyroïde homologue (171); mais il faut noter que cette production est plus importante lorsque la thyroglobuline a été traitée par des dérivés diazonium d'acide sulfanilique et d'acide arsanilique (166).

La raison pour laquelle les antigènes hétérologues ou soumis à l'action de différents agents chimiques sont plus aptes à provoquer l'élaboration d'auto-anticorps est mal connue.

Il est devenu classique d'expliquer l'apparition d'auto-immunisation par divers mécanismes :

- mise en contact avec le système immunitaire d'antigènes endogènes normalement séquestrés : antigène des spermatozoïdes, du cristallin, myéline,
- rupture de la tolérance par intervention d'une modification de l'antigénicité ou d'antigènes hétérologues.
- rupture de la tolérance sous l'action des adjuvants.

Il est habituel de séparer les affections autoimmunes -

rencontrées notamment en clinique - et de les attribuer à un dysfonctionnement du système immunitaire. On peut se demander si leur mécanisme n'est pas à rapprocher de celui qui est déclenché par les adjuvants de l'immunité. En ce qui concerne l'adjuvant de Freund, l'action est complexe car elle intéresse l'ensemble des cellules de la réaction immunitaire et se traduit par une augmentation de la synthèse de l'anticorps ainsi qu'une action de la sensibilité retardée (107). L'un des meilleurs exemples de la complexité des phénomènes est donné par l'étude de l'orchite allergique qui a montré à Toullet et coll. que l'immunisation de cobayes vis-à-vis de l'antigène P suggère l'intervention d'une réaction du type Arthus, alors que l'immunisation vis-à-vis de l'antigène S serait imputable à une réaction de sensibilité retardée de type cellulaire (152). Les lésions testiculaires apparaissent électivement lorsqu'il y a synergie entre l'immunité cellulaire et l'immunité humorale (21).

Dans certains cas la production d'auto-anticorps peut être obtenue sans l'intervention d'adjuvant, par introduction de certains types d'antigènes hétérospécifiques, notamment d'origine bactérienne, comme nous l'avons observé chez des lapins anti- Salmonella milwaukee. Mais le terme d'antigène hétérospécifique doit être nuancé, puisque l'auto-anticorps créé correspond à un antigène ayant des déterminants communs avec l'organisme du receveur. De plus, le rôle du receveur ne doit pas être négligé; l'on sait que certaines souches de cobaye ou de souris sont particulièrement aptes à élaborer des auto-anticorps. Cette propriété serait peut-être liée à la résistance à l'induction de la tolérance pour des antigènes solubles. (167).

La production d'auto-anticorps à la suite d'une immunisation anti-bactérienne est l'un des aspects de la formation d'auto-anticorps à la suite de l'injection d'antigène à réactivité croisée (8). Certaines bactéries Gram négatives possèdent des antigènes ayant une activité de groupes sanguins humains (38, 144), Kaplan et coll. ont montré qu'il existe des rapports entre une protéine d'un streptocoque du groupe A et des antigènes du muscle cardiaque de mammifères (84).

En ce qui concerne le tractus digestif, Broberger et Perlmann ont signalé la possibilité de l'existence de communautés antigéniques entre des bactéries intestinales et des constituants spécifiques de la muqueuse colique (18). Perlmann et coll. ont extrait, de Escherichia coli O 14, des fractions lipopolysaccharidiques susceptibles d'absorber l'anticorps des malades atteints de recto-colite hémorragique (109). Cet anticorps a été aussi mis en évidence vis-à-vis d'extract de colon de rat axénique. Ces résultats suggèrent que les bactéries ont un rôle stimulant dans l'élaboration des auto-anticorps chez ces malades.

Des auto-anticorps anti-colon et anti-estomac ont été mis en évidence par Asherson et Holborow (8) dans le sérum de lapins immunisés à l'aide de suspensions de bactéries Gram négatives, et plus spécialement Escherichia coli O 64 avec adjuvant complet de Freund. Pour notre part nous avons démontré que les antigènes bactériens, responsables de l'immunisation, étaient indépendants des antigènes de groupes sanguins et que les anticorps élaborés étaient capables de se fixer sur des coupes du tractus digestif du foetus de lapin, et donc dépourvues de contaminants bactériens (127).

L'immunisation par des antigènes gastriques hétérospécifiques, pratiquée par Holborow et coll., a fourni des auto-anticorps décelables par fixation du complément et immunofluorescence chez des lapins injectés avec des extraits de muqueuse gastrique de rat (75).

L'immunisation par des antigènes gastriques hétérologues peut produire une hypersensibilité retardée s'accompagnant au point de vue clinique, d'une gastrite transitoire, avec achlorhydrie : il en est ainsi des chiens immunisés par Hennes et coll. à l'aide de suc gastrique humain (63).

Nous avons aussi observé une gastrite allergique chez les lapins que nous avons immunisés avec l'extrait de muqueuse gastrique de Papio papio; il faut néanmoins noter que certains lapins non immunisés peuvent aussi présenter de discrètes lésions de la muqueuse gastrique (126). La preuve de l'origine autoimmunitaire du syndrome observé est difficile à apporter.

Cette gastrite allergique n'a pas été recherchée (8) ou observée par les autres auteurs (75), à l'exception de Hennes et coll. chez le chien.

L'immunisation vis-à-vis d'antigène gastrique isologue a aussi permis de provoquer l'apparition d'auto-anticorps contre la muqueuse gastrique. Ils ont été décelés chez les singes Macacus rhesus par Andrada et coll. par fixation du complément; l'immunofluorescence a précisé que l'anticorps se fixait sur le cytoplasme des cellules bordantes (3). Hennes avait observé une gastrite

transitoire avec achlorhydrie et hypersensibilité retardée chez des chiens immunisés à l'aide de suc gastrique isologue (63).

L'immunisation avec des antigènes purifiés, comme le facteur intrinsèque et le pepsinogène, peut aussi déclencher l'apparition d'auto-anticorps, lorsque les antigènes sont d'origine hétérospécifique .

A notre connaissance il n'y a pas eu de travaux expérimentaux consacrés à la production - chez l'animal - d'auto-anticorps anti-facteur intrinsèque, après immunisation hétérospécifique. Nous pensons être les premiers à avoir observé l'apparition de tels anticorps chez le Lapin recevant du facteur intrinsèque de porc. Cet anticorps est actif sur le complexe I.F.-B12 et il est révélé par autoradioimmunoélectrophorèse.

Nous n'avons pas pu déceler la présence de l'anticorps anti-facteur intrinsèque sur les cellules de la muqueuse gastrique de Lapin présentant des auto-anticorps anti-I.F., en effectuant un examen, en immunofluorescence directe des coupes de muqueuse gastrique. Nous n'avons pas de preuve que ces auto-anticorps aient eu un effet pathogène; l'examen hématologique répété de ces animaux n'a montré aucune anomalie. N'anmoins, nous n'avons pas pu éliminer l'existence de gastrite en foyer, notre exploration de la muqueuse gastrique ayant été évidemment limitée à certains prélèvements.

L'immunisation avec du pepsinogène hétérospécifique a aussi permis la production d'auto-anticorps. Il en est ainsi des lapins immunisés par Samloff et coll. avec du pepsinogène de porc, qui ont élaboré des anticorps précipitants pour un extrait de

muqueuse gastrique autologue (130). Comme dans le cas d'autres anticorps, cet auto-anticorps a pu avoir un effet stimulant sur les cellules intéressées et provoquer l'élévation de la concentration du pepsinogène sérique.

Nous avons observé, chez les lapins immunisés vis-à-vis du pepsinogène de porc, un anticorps précipitant - en immunoélectrophorèse - le pepsinogène de Lapin contenu dans un extrait de la muqueuse gastrique autologue. Nous n'avons pas pu rechercher la fixation, in vivo, de cet auto-anticorps, ni l'apparition de gastrite allergique.

Les résultats que nous avons obtenus s'accordent donc bien avec ceux qui ont été antérieurement rapportés par un nombre limité d'auteurs et qui concernent essentiellement la production d'auto-anticorps en utilisant des antigènes hétérologues ou hétérospécifiques, non purifiés ou purifiés.

Notre contribution a donc permis de démontrer l'apparition chez le Lapin d'auto-anticorps contre la muqueuse gastrique après immunisation vis-à-vis d'antigènes bactériens, d'extraits de muqueuse gastrique de Papio papio, de facteur intrinsèque et de pepsinogène de porc.

RESUME ET CONCLUSIONS

Ce travail a pour but l'étude analytique - par des techniques immunologiques - des constituants de la muqueuse gastrique du singe Papio papio.

Les résultats sont répartis en trois chapitres :

- Le premier d'entre eux est consacré à l'inventaire des constituants de la muqueuse gastrique :

Par analyse immunoélectrophorétique, nous avons mis en évidence douze constituants dans un extrait soluble de muqueuse gastrique fundique de singe. Ces antigènes sont classés et caractérisés selon leur mobilité électrophorétique relative. Certains de ces constituants sont aussi présents, à moindre concentration, dans d'autres organes du tube digestif.

A l'aide de réactions spécifiques de caractérisation, nous avons mis en évidence des glycoprotéines, une lipoprotéine, cinq zones d'activité protéolytique, un constituant fixant la vitamine B12, deux estérases carboxyliques, cinq lacticodéshydrogénases, une phosphatase acide ainsi qu'une peroxydase et une catalase. Un antigène a été identifié à la globuline IgA, après révélation à l'aide d'un immun-sérum anti-IgA humaine.

La topographie des antigènes correspondant à un auto-anticorps a été étudiée par immunofluorescence :

- l'antigène des cellules bordantes réagissant avec le sérum des malades atteints de divers syndromes avec auto-immunisation, en particulier l'anémie de Biermer,
- les antigènes mucopolysaccharidiques situés dans le cytoplasme

des cellules de l'épithélium de revêtement et dans les cellules muqueuses du col. Ces derniers ont été mis en évidence à l'aide de sérums de lapin immunisés par des injections de muqueuse gastrique hétérologue.

- Le deuxième chapitre traite des protéases.

Par électrophorèse en gélose à pH 5.6 d'extrait, et de coupes faites à la congélation, de la muqueuse gastrique de Papio papio, nous avons mis en évidence cinq protéases.

Nous les avons classées par ordre de mobilité décroissante selon la nomenclature proposée par Kushner et coll. (P I, P II, P III, P IVa et P IVb). La révélation de l'activité protéolytique est pratiquée après électrophorèse - selon la technique d'Uriel - par immersion dans un bain de sérum-albumine bovine tamponnée à pH 2.0 .

Nous avons montré que ces protéases ont les caractères des pepsinogènes de mammifères. En effet, l'activation à pH 2.0 a pour conséquences : la transformation des pepsinogènes en pepsines actives à pH 2.0 vis-à-vis de la S.A.B. (l'un d'entre eux, P III, se divise en deux enzymes), l'augmentation de la mobilité électrophorétique (conséquence de la perte de groupements basiques) et la sensibilité aux alcalis. L'activité protéolytique globale a été mesurée selon la technique originale d'Anson par digestion de l'hémoglobine et selon une adaptation de la technique de Lapresle et Webb, par digestion de la S.A.B. Le pH optimum d'activité de l'extrait brut et de chacune des pepsines isolées est voisin de pH 2.0 .

Les meilleures séparations de pepsinogènes de Papio papio

ont été réalisées sur DEAE-cellulose à pH 5.4 en tampon acétate, avec un gradient linéaire de ClNa, ce qui a permis l'étude des propriétés de chacun d'eux.

Cependant nous n'avons pas observé de différence dans leur activité pour un substrat protéique, ni dans leur sensibilité aux alcalis. Mais les résultats de l'immunoélectrophorèse et des épreuves d'absorption confirment leur pluralité et leur indépendance. Nous considérons donc les pepsinogènes de Papio papio comme un système d'isoenzymes.

Des communautés antigéniques entre chaque pepsinogène et la pepsine correspondante ont été observées par immunodiffusion en gélose.

L'existence de communautés antigéniques entre les pepsinogènes de porc et les pepsinogènes de Papio papio nous a permis d'obtenir des sérums de lapin anti-pepsinogène de porc réagissant avec les pepsinogènes de Papio papio. Ces sérums ont été employés pour localiser, par immunofluorescence, les granulations de pepsinogène dans le cytoplasme des cellules principales de la muqueuse fundique du singe Papio papio.

- Le troisième chapitre est consacré au facteur intrinsèque.

Les extraits de muqueuse gastrique de Papio papio renferment un constituant de mobilité électrophorétique 0.34, susceptible de se lier à la vitamine B12 (cyanocobalamine Co 58), comme le montre l'autoradioimmunoélectrophorèse. Ce constituant a été identifié au facteur intrinsèque, car il réagit avec les sérums de malades atteints d'anémie pernicieuse.

La molécule de facteur intrinsèque comprend deux sites

principaux : le site de fixation à la vitamine B12 et celui sur lequel se fixe l'anticorps après liaison avec la vitamine B12. Les anticorps de type "bloquant", c'est-à-dire actifs sur le premier site, ont été étudiés selon la méthode au charbon d'Ardeman et Chanarin. Les anticorps correspondant au deuxième site sont décelés par radioimmunoélectrophorèse, après migration de l'antigène (IF-B12) ou de l'anticorps (et dans ce cas, avec un sérum antiglobulines). Nous avons pu constater que la réponse primaire est caractérisée par l'élaboration simultanée de globulines IgG et IgM.

A l'aide de sérums de lapin anti-facteur intrinsèque de porc, nous démontrons l'existence de communautés antigéniques entre le facteur intrinsèque de singe Papio papio et le facteur intrinsèque de porc pour chacun des deux principaux sites de la molécule. Certains déterminants sont spécifiques d'espèce, alors que d'autres ne le sont pas. Les relations entre le site de fixation à la vitamine B12 du facteur intrinsèque d'homme, de singe et de porc ont également été établis, à l'aide de ces mêmes sérums et du sérum de Biermériers.

La localisation du facteur intrinsèque a été réalisée, par immunofluorescence indirecte, à l'aide des globulines IgG purifiées à partir des sérums de lapin anti-facteur intrinsèque de porc. Le facteur intrinsèque est secrété - chez le singe Papio papio - dans le cytoplasme des cellules bordantes.

Au terme de ce travail expérimental, nous voudrions en dégager les conclusions en montrant comment nous avons résolu

les problèmes rencontrés.

1° - La pluralité des protéases est maintenant admise par les différents groupes d'auteurs. Mais la discussion est très ouverte sur leur nombre, la signification de l'hétérogénéité et les critères de différenciation. La méthode d'électrophorèse des coupes nous est apparue comme une technique intéressante, à la fois pour éviter la dénaturation des enzymes et pour confirmer leur pluralité.

Par les réactions d'immunodiffusion en gélose et d'immunoélectrophorèse, nous avons pu établir l'identité antigénique de P IVa et P IVb, de P I et P II ainsi que l'absence de communautés entre le groupe P IV, P III et le groupe P I - P II. La classification des pepsinogènes que nous proposons est établie d'après leurs caractères physicochimiques (mobilité électrophorétique, comportement chromatographique ...) et leurs rapports antigéniques (identité, communauté ...).

2° - Nous proposons comme méthode de dosage de l'activité protéolytique, une adaptation de la technique de Lapresle et Webb, qui consiste à mesurer par le Biuret, les produits de dégradation de la S.A.B. Nous avons passé en revue les avantages de cette méthode, parmi lesquels il faut souligner le fait que - contrairement à la technique d'Anson - les témoins "blancs" sont négatifs avec les extraits tissulaires.

3° - Nous avons pu établir l'existence et les limites de communautés antigéniques entre les pepsinogènes de différentes espèces, ainsi qu'entre le facteur intrinsèque d'homme, de porc et de Panio papio. Ceci nous a permis, d'une part d'observer

l'apparition d'une autoimmunisation chez des lapins immunisés et, d'autre part de pratiquer, par immunofluorescence, la localisation de chacune de ces deux substances sur des coupes de muqueuse gastrique fundique de Papio papio.

4° - Nous avons montré que, avec les extraits de muqueuse gastrique de Papio papio, l'on disposait d'un bon substrat pour la recherche des anticorps anti-facteur intrinsèque chez les malades atteints ou suspects d'anémie de Biermer. Ces extraits peuvent être lyophilisés et conservés de manière quasi-indéfinie.

B I B L I O G R A P H I E

- 1 - ABELS, J., BOUMA, W., JANSZ, A., WOLDRING, M.G., BAKKER, A. and NIEWEG, H.O. : Experiments in the intrinsic factor antibody in serum from patients with pernicious anaemia. J. Lab. Clin. Med., 1963, 61, 893.
- 2 - ABELS, J. and SCHILLING, R.F. : Studies on antibody to intrinsic factor. Proc. 10th. Congr. Int. Soc. Haematol., Stockholm, 1964, p. C4.
- 3 - ANDRADA, J.A., ROSE, N.R. and ANDRADA, E.C. : Experimental autoimmune gastritis in the Rhesus monkey. Clin. exp. Immunol., 1969, 4, 293.
- 4 - ANSON, M.L. : The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. J. Gen. Physiol., 1939, 22, 79.
- 5 - ARDEMAN, S. and CHANARIN, I. : A method for the assay of human gastric intrinsic factor and for the detection and titration of antibodies against intrinsic factor. Lancet 1963, 2, 1350.
- 6 - ARDEMAN, S. and CHANARIN, I. : Assay of gastric intrinsic factor in the diagnosis of Addisonian pernicious anaemia. Brit. J. Haemat., 1965, 11, 305.
- 7 - ASHERSON, G.L. and DUMONDE, D.C. : V-Comparison of the antibody response after injection of rat and rabbit liver and brain. Immunology, 1964, 7, 1.
- 8 - ASHERSON, G.L. and HOLBOROW, E.J. : Autoantibody production in rabbits. Autoantibodies to gut produced by the injection of bacteria. Immunology, 1966, 10, 161.
- 9 - AUGUSTINSSON, K.B. : Multiple forms of esterase in vertebrate blood plasma. Ann. N.Y. Acad. Sci., 1961, 94, 844.
- 10 - BAKER, L.E. : New synthetic substrates for pepsin. J. Biol. Chem., 1951, 193, 809.
- 11 - BARNETT, E.V., DUMONDE, D.C. and GLYNN, L.E. : Induction of autoimmunity to adrenal gland. Immunology, 1963, 6, 382.
- 12 - BARRETT, A.J. : Properties of lysosomal enzymes p. 282, in DINGLE, J.T. and FELL, H.B. Lysosomes in Biology and Pathology, 2° vol., 1969, North Holland Pub. Co; Amsterdam.

- 13 - BEAUMONT, W. : Experiments and observations on the gastric juice and the physiology of digestion, un vol., 1833, Plattsburg, F.P. Allen. cité par WOLF, S. The stomach, un vol., 1965, Oxford Univ. Press New-York, 321 pages.
- 14 - BERNIER, G.M. and HINES, J.D. : Immunologic heterogeneity of autoantibodies in patients with pernicious anaemia. New Engl. J. Med., 1967, 277, 1386.
- 15 - BIERMER, A. : Über eine form von progressiver perniciöser anämie. Schweiz. Ärzte. 1872, 2, 15.
- 16 - BOHAK, Z. : Purification and characterization of chicken pepsinogen and chicken pepsin. J. Biol. Chem., 1969, 244, 4638.
- 17 - BOVEY, F.A. and YANARI, S.S. : Pepsin, p. 63 in BOYER, P.D., LARDY, H. and MYRBACK, K.: The enzymes, 4° vol., 2° éd., 1960, Academic Press, New-York.
- 18 - BROBERGER, O. and PERLMANN, P. : Autoantibodies in human ulcerative colitis. J. Exp. Med., 1959, 110, 657.
- 19 - BROMER, W.W. and DAVISSON, E.O. : Preparation and characterization of a clinically effective porcine intrinsic factor-vitamin B12 complex. Vitamin B12 and Intrinsic Factor, 2. Europäisches Symposium, Hamburg, 1961. (Ed. H.C. Heinrich). Enke Stuttgart.
- 20 - BROWN, G. et AVRAMEAS, S. : Mise en évidence en gélose des isoenzymes de déshydrogénases à NAD et à NADP. Bull. Soc. Chimie Biol., 1963, 45, 233.
- 21 - BROWN, P.C., GLYNN, L.E. and HOLBOROW, E.J. : The dual necessity for delayed hypersensitivity and circulating antibody in the pathogenesis of experimental allergic orchitis in guinea-pigs. Immunology, 1967, 13, 307
- 22 - BURSTONE, M.S. : Histochemical demonstration of acid phosphatases with naphthol AS phosphates. J. Nat. Cancer Inst., 1958, 21, 528.
- 23 - CAHN, A., und von MEHRING, J. : Die Säuren des gesunden und kranken Magens. Deutsches Archiv. f. klin. med., 1886, 39, 233.
- 24 - CANN, J.R. and GOAD, W.B. : Two or more electrophoretic zones from a single macromolecule. Ann. N.Y. Acad. Sci., 1968, 151, 638.
- 25 - CASTLE, W.B. : Observations on the etiologic relationship of achylia gastrica to pernicious anaemia. I. The effect of the administration to patients with pernicious anaemia of the contents of the normal human stomach recovered after ingestion of beef muscle. Am. J. med. Sci., 1929, 178, 748.

- 26 - CASTLE, W.B. : The Gordon Wilson Lecture : A century of curiosity about pernicious anaemia. Trans. Am. Clin. and Climat. Assoc., 1961, 73, 54.
- 27 - CHOSY, J.J. and SCHILLING, R.F. : Intrinsic factor studies. VII. The use of ion exchange chromatography, gel filtration, and ultrafiltration to purify the intrinsic factor of human gastric juice. J. Lab. Clin. Med., 1963, 61, 907.
- 28 - CHOW, R.B. and KASSELL, B. : Bovine pepsinogen and pepsin. J. Biol. Chem., 1968, 243, 1718.
- 29 - COOPER, B.A. and YATES, T. : Antibody to intrinsic factor-vitamin B12 complex in pernicious anaemia. Brit. J. Haemat., 1967, 13, 687.
- 30 - CORVISART, J.N. et LEROUX, J.J. : Observation sur une ouverture fistuleuse à l'estomac. J. Med., Chir., Pharm.... III, 407 Pluviose an x, 1802. cité par WOLF, S. ibidem.
- 31 - DESCHAMPS, M. : De la présure. J. Pharm. Paris, 1840, 26, 412.
- 32 - DIXON, M. and WEBB, E.C. : Enzymes. un vol. 1964, 2nde éd. Longmans, Green and Co. London. 950 pages.
- 33 - DUJARRIC DE LA RIVIERE, R. et EYQUEM, A. : Les groupes sanguins chez les animaux, un vol., 1953, Flammarion éd. Paris, 407 pages.
- 34 - DUMAS, J.B. : Traité de chimie appliquée aux arts., 1843, 6, 379 Bechet jeune, Paris. cité par WOLF, S. ibidem.
- 35 - ELLENBOGEN, L., BURSON, S.L. and WILLIAMS, W.L. : Purification of intrinsic factor. Proc. Soc. exp. Biol. and Med., 1958, 97, 760.
- 36 - ELLENBOGEN, L. and HIGHLEY, D.R. : Hog intrinsic factor. I. Isolation of vitamin B12 binding fractions from hog pylorus. J. Biol. Chem. 1967, 242, 1004.
- 37 - ETHERINGTON, D.J. and TAYLOR, W.H. : Nomenclature of the Pepsins. Nature, 1967, 216, 279.
- 38 - EYQUEM, A. et LE MINOR, L. : Recherches sur les communautés antigéniques entre les substances de groupes sanguins et les entérobactéries. Ann. Inst. Pasteur, 1965, 109, (sup.5), 85.
- 39 - FENWICK, S. : On atrophy of the stomach. Lancet, 1870, 2, 78.
- 40 - FISHER, J.M. and TAYLOR, K.B. : The intracellular localization of Castle's intrinsic factor by an immunofluorescent technique using autoantibodies. Immunology, 1969, 16, 779.

- 41 - FLEISCHMAN, J.B., PAIN, R.H. and PORTER, R.R. : Reduction of globulins. Arch. Biochem. Biophys., 1962, Sup. 1, 174
- 42 - FLEISHER, G.A., POTTER, C.S. and WAKIM, K.G. : Separation of 2 glutamicoxalacetic transaminases by paper electrophoresis. Proc. Soc. exp. Biol. and Med., 1960, 103, 229.
- 43 - FOX, H.J. and CASTLE, W.B. : Observations on the etiologic relationship of achylia gastrica to pernicious anaemia. IX. Difference in site of secretion of intrinsic factor in hog and in human stomach. Amer. J. Med. Sci., 1942, 203, 18.
- 44 - FREUDENBERG, E. und BUCHS, S. : Uber die zweite Protease des Magensaftes, das Kathepsin. Schweiz. Med. Wchschrft., 1940, 70, 249.
- 45 - FRUTON, J.S. and BERGMANN, M. : The specificity of pepsin. J. Biol. Chem., 1939, 127, 627.
- 46 - GARRIDO-PINSON, G.C., TURNER, M.D., CROOKSTON, J.H., SAMLOFF, I.M., MILLER, L.L. and SEGAL, H.L. : Studies of human intrinsic factor autoantibodies. J. Immunol., 1966, 97, 897.
- 47 - GLASS, G.B.J., UCHINO, H. and SCHWARTZ, G. Hemopoietic Factors. 8th International Congress of Hematology, Tokyo, 1960, 262.
- 48 - GLYNN, L.E. and HOLBOROW, E.J. : Distribution of blood group substances in human tissues. Brit. med. Bull., 1959, 15, 150.
- 49 - GOLDBERG, L.S., SAMLOFF, I.M. and BARNETT, E.V. : Studies on the antigenic structure of human and hog intrinsic factors. Clin. exp. Immunol., 1969, 5, 371.
- 50 - GOODMAN, H.C. : Antibodies to nucleoprotein extracts in patients with lupus erythematosus and rabbits immunized with nucleoprotein extracts. Clin. Res., 1959, 7, 264.
- 51 - GOTTLIEB, C., LAU, K.S., WASSERMAN, L.R. and HERBERT, V. : Rapid charcoal assay for intrinsic factor (IF), gastric juice unsaturated binding capacity, antibody to IF, and serum unsaturated B12 binding capacity. Blood, 1965, 25, 875.
- 52 - GRABAR, P., URIEL, J. et COURCON, J. : L'analyse immunoélectrophorétique du sérum humain normal. Mobilités électrophorétiques. Ann. Inst. Pasteur, 1960, 99, 13.
- 53 - GRABAR, P. et WILLIAMS, C.A. : Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines. Application au sérum sanguin. Biochim. Biophys. Acta, 1953, 10, 193.

- 54 - GRABAR, P. et WILLIAMS, C.A. : Méthode immunoélectrophorétique d'analyse de mélanges de substances antigéniques. Biochim. Biophys. Acta, 1955, 17, 67.
- 55 - GRÄSBECK, R., SIMONS, K. and SINKKONEN, I. : Purification of intrinsic factor and vitamin B12 binders from human gastric juice. Ann. Med. Exptl. Biol. Fenniae, 1962, 40, supp. 6, 1.
- 56 - GRÄSBECK, R., SIMONS, K. and SINKKONEN, I. : Isolation of intrinsic factor and its probable degradation product, as their vitamin B12 complexes, from human gastric juice. Biochim. biophys. Acta, 1966, 127, 47.
- 57 - GULLBERG, R. and KISTNER, S. : Immunologic studies of intrinsic factor. The reactions of experimentally produced antisera to human and hog intrinsic factor and of sera from pernicious anaemia patients. Acta med. scand., 1963, 174, 573.
- 58 - GULLBERG, R., KISTNER, S., BOTTIGER, L.E. and EVALDSONN, V. : Precipitating serum antibodies to intrinsic factor in pernicious anaemia. Acta med. scand., 1966, 180, 87.
- 59 - HALBERT, S.P., LOCATCHER-KHORAZO, D., SWICK, L., WITMER, R., SEEGAL, B. and FITZGERALD, P. : Homologous immunological studies of ocular lens. I. In vitro observations. J. exp. Med., 1957, 105, 439.
- 60 - HAMMARSTEN, O. : Om mjolk-ystningen och de dervid verksamma fermenterna : magslemhinnan. Uppsala Läkarefören. Förhandl., 1872, 8, 63.
- 61 - HANLEY, W.B., BOYER, S.H. and NAUGHTON, M.A. : Electrophoretic and Functional Heterogeneity of Pepsinogen in several Species. Nature, 1966, 209, 996.
- 62 - HEIRWEGH, K. and EDMAN, P. : Purification and N-terminal determination of crystalline pepsin. Biochim. Biophys. Acta, 1957, 24, 219.
- 63 - HENNES, A.R., SEVELIUS, H., LEWELLYN, T., JOEL, W., WOODS, A.H. and WOLF, S. : Atrophic gastritis in dogs. Arch. Path., 1962 73, 281.
- 64 - HERBERT, V., GOTTLIEB, C.W. and LAU, K.S. : Hemoglobin-coated Charcoal assay for serum Vitamin B12. Blood, 1966, 28, 130.
- 65 - HERBERT, V., GOTTLIEB, C.W., LAU, K.S. and WASSERMAN, L.R. : Intrinsic factor assay. Lancet, 1964, 2, 1017.
- 66 - HERRIOTT, R.M. : Kinetics of the formation of pepsin from swine pepsinogen and identification of an intermediate compound. J. Gen. Physiol., 1939, 22, 65.

- 67 - HIRSCH-MARIE, H. : Caractérisation des zymogènes et enzymes protéolytiques de l'estomac humain. Thèse Doctorat ès Sciences, Paris, 1966.
- 68 - HIRSCH-MARIE, H. : Dosage immuno-chimique du pepsinogène et de la pepsine gastrique et urinaire par la méthode de Laurell. Clin. Chim. Acta, 1969, 24, 411.
- 69 - HIRSCH-MARIE, H., BURTIN, P. et CONTE, M. : Etude électrophorétique et immunoélectrophorétique des enzymes protéolytiques du suc gastrique normal et pathologique. Acta Gastro-Enterolog. Belgica, 1965, 28, 373.
- 70 - HIRSCH-MARIE, H. et CONTE, M. : Etude du pepsinogène urinaire et de ses corrélations avec la sécrétion protéolytique gastrique. Rev. Franç. Et. Clin. Biol., 1969, 14, 977.
- 71 - HIRSCH-MARIE, H., CONTE, M. et BURTIN, P. : Les protéases du suc gastrique normal et pathologique. Electrophorèse en gélose et immunoélectrophorèse. Rev. Franç. Et. Clin. Biol., 1965, 10, 925.
- 72 - HOEDEMAEKER, P.J., ABELS, J., WACHTERS, J.J., ARENDS, A. and NIEWEG, H.O. : Investigations about the site of production of Castle's gastric intrinsic factor. Lab. Invest., 1964, 13, 1394.
- 73 - HOEDEMAEKER, P.J., ABELS, J., WACHTERS, J.J., ARENDS, A. and NIEWEG, H.O. : The differences in the site of production of Castle's gastric intrinsic factor in animal species. Proc. 10th. Congr. europ. Soc. Haemat., Strasbourg, 1965, 2, 118.
- 74 - HOEDEMAEKER, P.J., ABELS, J., WACHTERS, J.J., ARENDS, A. and NIEWEG, H.O. : Further investigations about the site of production of Castle's gastric intrinsic factor. Lab. Invest., 1966, 15, 1163.
- 75 - HOLBOROW, E.J., ASHERSON, G.L. and WIGLEY, R.D. : Autoantibody production in rabbits. VI. The production of autoantibodies against rabbit gastric, ileac and colonic mucosa. Immunology, 1963, 6, 551.
- 76 - HOLDSWORTH, E.S. : The preparation of intrinsic factor by means of modified cellulose ion-exchange columns. (Abstract). Biochem. J., 1957, 66, 59P.
- 77 - HOLDSWORTH, E.S. : The isolation and properties of intrinsic factor and vitamin B12 binding substances from pig pylorus. Biochim. Biophys. Acta, 1961, 51, 295.
- 78 - IMAI, M., SHIBATA, T. and MINEDA, T. : Histological and histochemical investigation on the stomachs in man, Japanese monkey (*Macaca fuscata yakui*) and some other kind of animals. II What is the mucous neck cell ? Okajimas Fol. Anat. Jap., 1967, 43, 103.

- 79 - IRVINE, W.J. : Immunoassay of gastric intrinsic factor and the titration of antibody to intrinsic factor. Clin. exp. Immunol., 1966, 1, 99.
- 80 - JACOB, T.A., WILLIAMS, D.E., HOWE, E.E. and GLASS, G.B.J. : Ultracentrifugation and paper electrophoresis of highly active intrinsic factor preparations (Letter). Archs. Biochem. Biophys., 1959, 81, 522.
- 81 - JEFFRIES, G.H., HOSKINS, D.W. and SLEISENGER, M.H. : Antibody to intrinsic factor in serum from patients with pernicious anaemia. J. Clin. Invest., 1962, 41, 1106.
- 82 - KAKEI, M. and GLASS, G.B.J. : Separation of bound and free vitamin B12 on Sephadex G-25 column. Proc. Soc. exp. Biol. and Med., 1962, 111, 270.
- 83 - KAPLAN, M.H. : Immunologic studies of heart tissue. I. Production in rabbits of antibodies reactive with an autologous myocardial antigen following immunization with heterologous heart tissue. J. Immunol., 1958, 80, 254.
- 84 - KAPLAN, M.H. : Immunologic relation of streptococcal and tissue antigens. I. Properties of an antigen in certain strains of group A streptococci exhibiting an immunologic cross-reaction with human heart tissue. J. Immunol., 1963, 90, 595.
- 85 - KAPLAN, M.E., ZALUSKY, R., REMINGTON, J. and HERBERT, V. : Immunologic studies with intrinsic factor in man. J. Clin. Invest., 1963, 42, 368.
- 86 - KIDD, J.G. and FRIEDEWALD, W.F. : A natural antibody that reacts in vitro with a sedimentable constituent of normal tissue cells. J. exp. Med., 1942, 76, 543.
- 87 - KUSHNER, I., RAPP, W. and BURTIN, P. : Electrophoretic and immunochemical demonstration of the existence of 4 human pepsinogens. J. Clin. Invest., 1964, 45, 1983.
- 88 - LANDBOE-CHRISTENSEN, E. and PLUM, C.M. : Experimental study on the localization of Castle's intrinsic factor in the human stomach; anti-anemic effect of powdered human fundus and pylorus. Amer. J. Med. Sci., 1948, 215, 17.
- 89 - LANGLEY, J.N. : J. Physiol. (Lond), 1882, 3, 246, cité par WOLF, S. ibidem.
- 90 - LAPRESLE, C. and WEBB, T. : Study of a proteolytic enzyme from rabbit spleen. Biochem. J., 1960, 76, 538.
- 91 - LAPRESLE, C., and WEBB, T. : The purification and properties of a proteolytic enzyme, rabbit cathepsin E, and further studies on rabbit cathepsin D. Biochem. J., 1962, 84, 455.

- 92 - LEE, D. and RYLE, A.P. : Pepsinogen D. A fourth proteolytic zymogen from pig gastric mucosa. Biochem. J., 1967, 104, 735.
- 93 - LEWIS, J.H. : The immunologic specificity of brain tissue. J. Immunol., 1933, 24, 193.
- 94 - LOWENSTEIN, L., COOPER, B.A., BRUNTON, L. and GARTHA, S. : An immunologic basis for acquired resistance to oral administration of hog intrinsic factor and vitamin B12 in pernicious anaemia. J. Clin. Invest. 1961, 140, 1655.
- 95 - LUNDQUIST, F. and SEEDORF, H.H. : Pepsinogen in human seminal fluid. Nature 1952, 170, 1115.
- 96 - MARKERT, C.L. and APPELLA, E. : Immunochemical properties of lactate dehydrogenases isozymes. Ann. N.Y. Acad. Sci., 1963, 103, 915.
- 97 - MARKERT, C.L. and MØLLER, F. : Multiple forms of enzymes : tissue, ontogenetic, and species specific patterns. Proc. Nat. Acad. Sci., 1959, 45, 753.
- 98 - MERRETT, T.G., BAR-ELI, E. and VAN VUNAKIS, H. : Pepsinogens A, C and D from the smooth dogfish. Biochemistry, 1969, 8 3696.
- 99 - METZGAR, R.S. : Immunologic studies of pancreas specific isoantigens. J. Immunol., 1964, 93, 176.
- 100 - MEULENGRACHT, E. : The presence of anti-anemic factor in preparations of dried stomach substance from the cardia, fundus and pylorus, respectively. Acta Med. Scand., 1934, 82, 352.
- 101 - MINOT, G.R. and MURPHY, W.P. : Treatment of pernicious anaemia by a special diet. J. Amer. med. Ass., 1926, 87, 470.
- 102 - MOLLIN, D.L. and ROSS, G.I.M. : Vitamin B12 deficiency in the megaloblastic anaemia. Proc. R. Soc. Med., 1954, 47, 428.
- 103 - MORAX, V. et BOLLACK, J. : Recherches expérimentales sur les réactions anaphylactiques produites par les albuminoïdes du cristallin. Ann. Inst. Pasteur, 1914, 28, 625.
- 104 - NORTHROP, J.H. : Crystalline Pepsin. I. Isolation and Tests of Purity. J. Gen. Physiol., 1930, 13, 739.
- 105 - NORTHROP, J.H. : Crystallization of pepsin from alcohol. J. Gen. Physiol., 1946, 30, 177.
- 106 - OUCHTERLONY, O. : Antigen antibody reactions in gels. Arkiv. for Kemi, 1949, 26, 141.
- 107 - PARAF, A. : Mecanisme d'action des adjuvants de l'immunité. Ann. Inst. Pasteur, 1970, 118, 418.

- 108 - PERLMANN, G.E. : Formation of Enzymatically active dialysable Fragments during autodigestion pepsin. Nature, 1954, 173, 406.
- 109 - PERLMANN, P., HAMMARSTROM, S., LAGERCRANTZ, R. and CAMPBELL, D. : Autoantibodies to colon in rats and human ulcerative colitis : cross-reactivity with E. coli O 14 antigen. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 1967, 125, 975.
- 110 - PROUT, W. : On the nature of the acid and saline matters usually existing in the stomachs of animals. Philos. Trans., 1824, 114, 45, cité par WOLF, S. ibidem.
- 111 - RAJAGOPALAN, T.G., MOORE, S. and STEIN, W.H. : Pepsin from pepsinogen. Preparation and properties. J. Biol. Chem., 1966, 241, 4940.
- 112 - RAMSEY, C. and HERBERT, V. : Dialysis assay for intrinsic factor and its antibody : demonstration of species specificity of antibodies to human and hog intrinsic factor. J. Lab. Clin. Med., 1965, 65, 143.
- 113 - RAPP, W., ARONSON, S.B., BURTIN, P. and GRABAR, P. : Constituents and antigens of normal human gastric mucosa as characterized by electrophoresis and immunoelectrophoresis in agar gel. J. Immunol., 1964, 92, 579.
- 114 - REAUMUR, R.A.F. de : Sur la digestion des oiseaux. Mém. Acad. Roy. Sc. Paris, 1752, 266, cité par WOLF, S. ibidem.
- 115 - RICKES, E.L., BRINK, N.G., KONIUSZY, F.R., WOOD, T.R. and FOLKERS, K. : Crystalline vitamin B12. Science, 1948, 107, 396.
- 116 - RICHMOND, V., CAPUTTO, R. and WOLF, S. : Fractionation of the nondialysable, soluble components of gastric contents by chromatography on Amberlite IRC-50. Archs. Biochem. Biophys., 1957, 66, 155.
- 117 - RICHMOND, V., TANG, J., WOLF, S., TRUCCO, R.E. and CAPUTTO, R. : Chromatographic isolation of gastricsin, the proteolytic enzyme from gastric juice with pH optimum 3.2 . Biochim. Biophys. Acta, 1958, 29, 453.
- 118 - RINDERKNECHT, H., GEOKAS, M.C., SILVERMAN, P and HAVERBACK, B.J. : A new ultrasensitive method for the determination of proteolytic activity. Clin. Chim. Acta, 1968, 21, 197.
- 119 - RØDBRO, P., CRISTIENSEN, P.M. and SCHWARTZ, M. : Intrinsic factor secretion in stomach diseases. Lancet, 1965, 2, 1200.
- 120 - ROITT, I.M., DONIACH, O. and SHAPLAND, C. : Auto-immuno phenomenons in relation to the gastric mucosa in human disease. Fourth Int. Symposium Immuno-Pathology, Monaco 1965. Schwabe and Co. 1966, Basel-Stuttgart, 314.

- 121 - ROITT, I.M., DONIACH, D. and SHAPLAND, C. : Intrinsic factor autoantibodies. Lancet, 1964, 2, 469.
- 122 - RYLE, A.P. : Pepsinogen B : the Zymogen of Pepsin B. Biochem. J., 1965, 96, 6.
- 123 - RYLE, A.P. and PORTER, R.R. Parapepsins : 2 proteolytic enzymes associated with porcine pepsins. Biochem. J., 1959, 73, 75.
- 124 - SAINT MARTIN, J. de : Etude immunologique des pepsinogènes de la muqueuse gastrique du singe Papio papio. Ann. Inst. Pasteur, 1969, 117, 828.
- 125 - SAINT MARTIN, J. de : Communautés antigéniques entre les pepsinogènes de singe et de porc. Localisation des pepsinogènes dans la muqueuse gastrique du singe Papio papio par immunofluorescence. Ann. Inst. Pasteur, 1970, 119, 110.
- 126 - SAINT MARTIN, J. de et EYQUEM, A. : Recherches sur les autoanticorps anti-gastriques après hétéroimmunisation. 9^e Congrès Intern. Microb. Moscou, 1966, 651.
- 127 - SAINT MARTIN, J. de et EYQUEM, A. : Apparition d'iso- et d'autoanticorps contre le tractus digestif au cours d'immunisation anti-bactérienne. Ann. Inst. Pasteur, 1967, 113, 591.
- 128 - SAMLOFF, I.M. and BARNETT, E.V. : Identification of intrinsic factor auto-antibody and intrinsic factor in man by radioimmunoassay and radioimmunoelectrophoresis. J. Immunol., 1965, 95, 536.
- 129 - SAMLOFF, I.M. and BARNETT, E.V. : Heterogeneity and sequence of appearance of rabbit antibodies to hog intrinsic factor. J. Immunol., 1967, 98, 558.
- 130 - SAMLOFF, M., BARNETT, E.V. and TURNER, M.D. : Immunization of rabbits with hog pepsinogen. I. Autoantibodies to pepsinogen and elevated serum pepsinogen. Gastroenterology, 1967, 52, 165.
- 131 - SCHLAMOWITZ, M. and PETERSON, L.U. : The effect of sodium chloride on peptic digestion of bovine serum albumin. Biochim. Biophys. Acta, 1961, 46, 381.
- 132 - SCHULTZE, H.E. and HEREMANS, J.F. : Molecular Biology of human proteins vol. 1., 1966, Elsevier Pub. Co., Amsterdam, 903 pages.
- 133 - SCHWANN, Th. : Über das Wesen des Verdauungs processes. Müller's Arch. Berlin, 1836, 90.
- 134 - SCHWARTZ, M. : Intrinsic-factor-inhibiting substance in serum of orally treated patients with pernicious anaemia. Lancet, 1958, 2, 61.

- 135 - SCHWARTZ, M. : Intrinsic factor antibody in serum from patients with pernicious anaemia, Lancet, 1960, 2, 1263.
- 136 - SCHWARTZ, M., LOUS, P. and MEULENGRACHT, E. : Reduced effect of heterologous intrinsic factor after prolonged treatment in pernicious anaemia. Lancet, 1957, 1, 751.
- 137 - SEIJFFERS, M.J., MILLER, L.L. and SEGAL, H.L. : Effect on concentration of substrate and of chloride on the optimum pH for the proteolysis of bovine serum albumin by human pepsin III. Biochemistry, 1964, 3, 5.
- 138 - SEIJFFERS, M.J., SEGAL, H.L. and MILLER, L.L. : Separation of pepsin I, pepsin II A, pepsin II B and pepsin III from human gastric mucosa. Amer. J. Physiol., 1963, 205, 1099.
- 139 - SEIJFFERS, M.J., SEGAL, H.L. and MILLER, L.L. : Separation of pepsinogen I, pepsinogen II and pepsinogen III from human gastric mucosa. Amer. J. Physiol., 1963, 205, 1106.
- 140 - SHARP, E.A. : Anaemic factor in desiccated stomach. J. Amer. med. Ass., 1929, 93, 749.
- 141 - SIEGEL, L. and ENGLARD, S. : A comparative study of two malic dehydrogenases from beef heart. Fed. Proc., 1961, 20, 239.
- 142 - SMITH, E.L. and PARKER, L.F.J. Purification of anti-pernicious anaemia factor (Abstract). Biochem. J., 1948, 43, viii.
- 143 - SPALLANZANI, A.L. : Delle digestione degli animale. In Fisica animale, Venice 1782, cité par WOLF, S. ibidem.
- 144 - SPRINGER, C.F., WILLIAMSON, P. and BRANDES, W.C. : Blood group activity of Gram-negative bacteria. J. exp. Med., 1961, 113, 1077.
- 145 - STURGIS, C.C. and ISAACS, R. : Desiccated stomach in the treatment of pernicious anaemia. J. Amer. med. Ass., 1929, 93, 747.
- 146 - SULLIVAN, L.W., HERBERT, V. and CASTLE, W.B. : In vitro assay for human intrinsic factor. J. Clin. Invest., 1963, 42, 1443.
- 147 - TANG, J. and TANG, K.I. : Purification and properties of a zymogen from human gastric mucosa. J. Biol. Chem., 1963, 238, 606.
- 148 - TAYLOR, K.B. : Inhibition of intrinsic factor by pernicious anaemia sera. Lancet, 1959, 2, 106.
- 149 - TAYLOR, K.B. and MORTON, J.A. : An antibody to Castle's Intrinsic Factor. Lancet, 1958, 1, 29.

- 150 - TAYLOR, K.B. and MORTON, J.A. : An antibody to Castle's Intrinsic Factor. J. Path. Bact., 1959, 77, 117.
- 151 - THORNE, C.J.R., GROSSMAN, L.I. and KAPLAN, N.O. : Starch gel electrophoresis of malate dehydrogenase. Biochim. Biophys. Acta., 1963, 73, 193.
- 152 - TOULLET, F., VOISIN, G.A. et NEMIROVSKY, M. : Localisation cytologique et pouvoir pathogène des auto-antigènes de spermatozoïdes chez le cobaye. Ann. Inst. Pasteur, 1970, 118, 513.
- 153 - TURNER, M.D., MANGLA, J.C., SAMLOFF, I.M., MILLER, L.L. and SEGAL, H.L. : Studies on the heterogeneity of human gastric zymogens. Biochem. J., 1970, 116, 397.
- 154 - URIEL, J. : Réactions de caractérisation des constituants protéiques après électrophorèse ou immunoélectrophorèse en gélose. p. 39 in GRABAR, P. et BURTIN, P. Analyse immunoélectrophorétique. Ses applications aux liquides biologiques humains. un vol., 1960, Masson édit. Paris, 294 p.
- 155 - URIEL, J. : *ibid.* p. 48.
- 156 - URIEL, J. : *ibid.* p. 49.
- 157 - URIEL, J. : A method for the direct detection of proteolytic enzyme after electrophoresis in agar gel. Nature, 1960, 188, 853.
- 158 - URIEL, J. : Caractérisation des cholinestérases et d'autres estérases carboxyliques après électrophorèse et immunoélectrophorèse en gélose. Ann. Inst. Pasteur, 1961, 101, 104.
- 159 - URIEL, J. : Méthode d'électrophorèse dans des gels de polyacrylamide agarose. Bull. Soc. Chim. Biol., 1966, 48, 969.
- 160 - URIEL, J. : in Methods in Immunology and Immunochemistry par WILLIAMS, C.A. and CHASE, M.W. 3° vol., 1970 sous presse, Acad. Press édit. New-York.
- 161 - URIEL, J. et GRABAR, P. : Une nouvelle réaction de caractérisation des glycoprotéines et des polysaccharides après électrophorèse ou immunoélectrophorèse en gélose. I. Application à l'étude des glycoprotéines sériques. Prot. Biol. Fluids, Proc. 6th Colloq. Bruges, 1960, 195.
- 162 - VAN VUNAKIS, H. and HERRIOTT, R.M. : Structural changes associated with the conversion of pepsinogen to pepsin. I. The N. terminal A.A. residue and A.A. composition of the pepsin inhibitor. Biochim. Biophys. Acta, 1956, 22, 537.
- 163 - VAN VUNAKIS, H. and LEVINE, L. : Structural studies on Pepsinogen and Pepsin : an Immunological Approach. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1963, 103, 735.

- 164 - VOISIN, G.A. : Table ronde sur les Mécanismes des Lésions Auto-immunitaires. Ann. Inst. Pasteur, 1970, 118, 575.
- 165 - WACKER, W.B. and DODD, M.C. : The immunologic response of rabbits to homologous and heterologous corneal and uveal tissue. J. Immunol., 1961, 86, 690.
- 166 - WEIGLE, W.O. : The induction of autoimmunity in rabbits following injection of heterologous or altered homologous thyroglobulin. J. exp. Med., 1965, 121, 289.
- 167 - WEIR, D.M. : Altered antigens and autoimmunity. Vox Sang., 1969, 16, 304.
- 168 - WEST, R. : Activity of vitamine B12 in Addisonian pernicious anaemia Science, 1948, 107, 398.
- 169 - WIELAND, Th. und PFLEIDERER, G. : Nachweis der Heterogenität von Milchsäure - dehydrogenasen verschiedenen Ursprungs durch Trägerelectrophorese. Biochem. Z., 1959, 329, 112.
- 170 - WILKINSON, J.F. : Pernicious anaemia. Preliminary report on the results obtained by treatment with certain preparations of stomach. Brit. med. J., 1930, 1, 236.
- 171 - WITEBSKY, E. and ROSE, N.R. : Studies on organ specificity. IV. Production of rabbit thyroid antibodies in the rabbit. J. Immunol., 1956, 76, 408.
- 172 - WOLF, S. : The Stomach, un vol., 1965, Oxford Univ. Press, New-York, 321 p.
- 173 - YASUDA, K., SUZUKI, T. and TAKANO, K. : Localization of pepsin in the stomach revealed by fluorescent antibody technique. Okajimas Fol. anat. Jap., 1966, 42, 355.

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

Vu et approuvé

Paris, le ..11.. JANVIER... 1971..

Le Doyen de la Faculté des Sciences
de Paris

L. GAUTHIER

Vu
et permis d'imprimer

Le Recteur de l'Académie de Paris

R. MALLET.

